

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**Estudo da Atividade Antioxidante, Inibição do Enzima AChE e
Interação com Sinvastatina (Fármaco Inibidor da Biossíntese do
Colesterol)**

Maria João da Silva Ribeiro

Dissertação
Mestrado em Química
Química

2014

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**Estudo da Atividade Antioxidante, Inibição do Enzima AChE e
Interação com Sinvastatina (Fármaco Inibidor da Biossíntese do
Colesterol)**

Maria João da Silva Ribeiro

Dissertação
Mestrado em Química
Química

Orientador: Professora Doutora Maria Luísa Serralheiro

2014

Agradecimentos

O facto de ter consigo realizar este trabalho, deve-se a vários contributos, sem os quais não teria sido possível.

Em primeiro lugar, o meu grande obrigado à minha orientadora, a Professora Doutora Maria Luísa Serralheiro, por ter aceite ser minha orientadora, e ter permitido que pudesse fazer o meu trabalho experimental no seu laboratório.

Ao Doutor Pedro Falé, um agradecimento especial, uma vez que me acompanhou durante grande parte do meu percurso pelo laboratório. É de notar a sua paciência extraordinária, bem como o tempo que teve que dispensar para que conseguisse fazer o meu trabalho. Agradeço também a identificação dos compostos por LC-DAD e LC-MS efetuada para as infusões comerciais.

Às Colegas, Andreia e Maria João, do Instituto Superior Técnico, que ajudaram à realização do trabalho. À Elsa por me ter acompanhado e ter tornado alguns dias mais fáceis. À Telma pela ajuda nos dias mais preenchidos.

Ao Ricardo, por ter estado presente ao longo de todo este percurso, e de ter acompanhado o meu trabalho, pela sua paciência nos dias em que tudo correu menos bem e em especial pelo apoio que sempre me deu, nunca me deixando desistir.

À minha família, essencialmente aos meus pais, pois sem eles não teria certamente conseguido seguir o que gosto, bem como terem suportado esta minha decisão. À minha tia pelo apoio, sempre.

Ao Zé Manuel, pelo seu apoio incondicional; por sempre me ter dito que tudo era possível, bastava apenas um esforço da minha parte bem como por sempre me ter mostrado que por vezes, temos que sair da nossa zona de conforto para conseguir o que queremos.

A todos os que de uma forma ou outra, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

As plantas têm sido usadas sob forma de infusões para melhorar os sintomas associados a diversas patologias nomeadamente diminuição de memória doenças cardiovasculares.

Neste trabalho foram analisadas folhas de planta “kiwi” (*Actinidia chinensis*) e infusões de misturas de plantas, comerciais, todas elas com indicações para facilitar o trânsito digestivo e redução do colesterol na corrente sanguínea. Procedeu-se à identificação de alguns componentes na decocção das folhas da planta de “kiwi” por HPLC-DAD e LC-MS, tendo-se determinado a atividade antioxidante e inibitória de acetilcolinesterase. A composição química evidenciou compostos derivados de flavonoides, sem existência de derivados de ácido cafeico. As folhas de “kiwi” apresentaram um valor de EC_{50} de $0,586 \pm 0,027$ μ g/ml e os extratos das plantas comerciais designadas por A, B e C tiveram os valores de $0,430 \pm 0,004$ mg/ml, $0,443 \pm 0,023$ mg /ml, e $0,497 \pm 0,25$ mg respetivamente. No que respeita à inibição de acetilcolinesterase, os valores de IC_{50} para as folhas de “kiwi”, e extratos de plantas comerciais A-C foram $0,801 \pm 0,02$ mg/ml, $0,61 \pm 0,08$ mg/ml, $0,668 \pm 0,09$ mg/ml, e $0,588 \pm 0,15$ mg/ml respetivamente. Os ensaios de digestão feita com sucos artificiais demonstraram não haver alterações na composição química dos extratos. Foram efetuados estudos de toxicidade dos extratos em células HepG2. Realizaram-se ensaios sobre a inibição do enzima HMG-CoA reductase usando simultaneamente extratos das plantas e fármaco mais comum para redução do colesterol, sinvastatina.

Palavras-chave: AChE, atividade antioxidante, HMG-CoA reductase, compostos fenólicos, Células HepG2.

Abstract

Plants have been used like infusions to improve the symptoms associated to a large variety of pathologies as lost of memory and cardiovascular diseases.

In this work, “kiwi” leave (*Actinidia chinensis*) has been analysed, so as another three commercial herbal infusions, all of them to facilitate digestive transit and cholesterol reduction in the blood circulation. HPLC-DAD e LC-MS has been made to identify some compounds in the decoctions, and antioxidant activity as well as acetylcholinesterase activity have also been determined. The chemical composition showed that flavonoid derivatives were the main compounds, there were no traces of caffeic acid derivatives. The “kiwi” leaves showed an EC₅₀ value of 0,586±0,027 µg/ml, and the three commercial infusion A-C shown 0,434± 0,004 µg/ml, 0,443±0,023 µg/ml, and 0,497±0,25 µg/ml respectively. Acetylcholinesterase activity shown an IC₅₀ value for the “kiwi” leaves and infusions A-C, 0,801±0,02 mg/ml, 0,61±0,08 mg/ml, 0,668±0,09 mg/ml, and 0,588±0,15 mg/ml respectively. The digestion trials made with artificial juices showed that the chemical composition of the extracts was kept constant. Studies were made to determine the extract toxicity to HepG2 cells. The using simultaneous use of the plant extracts and the drug used to reduce cholesterol, simvastatin on the inhibition of HMG-CoA reductase enzyme was analysed.

Keywords: AChE, antioxidant activity, HMG-CoA reductase, phenolic compounds, HepG2 cells.

Abreviaturas e siglas

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChI	Iodeto de acetilcolina
ATP	Adenosina trifosfato (Do inglês <i>Adenosine triphosphate</i>)
BHT	Hidroxitolueno butilado (Do inglês <i>Butylated hydroxytoluene</i>)
DMEM	Do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Do inglês <i>Desoxiribonucleic acid</i>)
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil (Do inglês <i>2,2-diphenylpicrylhydrazyl</i>)
DTNB	5-5'-Ditiobis[2-ácido nitrobenóico]
ESI	Do inglês <i>Electrospray Ionisation</i>
HBSS	Do inglês <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HDL	Lipoproteínas de elevada densidade (Do inglês <i>high density-lipoproteins</i>)
HMGR	Do inglês <i>3-hidroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase</i>
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta resolução (Do inglês <i>High Precision Liquid Chromatography-Diode Array Detector</i>)
IC ₅₀	Concentração de amostra que corresponde a 50% de inibição
IPP	Do inglês <i>Isopentenyl pyrophosphate</i>
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade (Do inglês <i>low density-lipoproteins</i>)
MgCl ₂ .6H ₂ O	Cloreto de magnésio hexahidratado
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-1-il]-2,5-difenil-tetrazólico
NaCl	Cloreto de sódio
PBS	Tampão de sais fosfato (Do inglês <i>Phosphates buffer solution</i>)

Pen-strep	Penicilina e estreptomicina
SNC	Sistema Nervoso Central
TFA	Ácido triffuoroacético (Do inglês <i>Trifluoroacetic acid</i>)
TRIS	<i>tris</i> (hidroximetil)aminometano
t_r	Tempo de retenção
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade (Do ingles <i>Very Low Density- Lipoproteins</i>)

Índice

Agradecimentos	i
Resumo.....	ii
Abstract	iii
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas.....	x
Índice de Quadros	xi
1. Introdução	1
2. Objetivos	4
3. Revisão Bibliográfica.....	5
3.1. Doenças do Sistema Colinérgico	5
3.2. Doenças Cardiovasculares	6
3.2.1. Colesterol: biossíntese e inibição	7
3.2.2. HMG-CoA reductase.....	10
3.3. Atividade antioxidante e processos inflamatórios.....	11
3.4. Compostos Fenólicos.....	12
4. Procedimento experimental	15
4.1. Materiais.....	15
4.1.1. Material vegetal e Preparação de extratos.....	15
4.1.2. Reagentes	16
4.1.3. Linhas celulares.....	16
4.1.4. Equipamento	16
4.2. Métodos	17
4.2.1. Preparação de extratos	17
4.2.2. Análise de extratos por HPLC-DAD e LC-MS.....	17
4.2.3. Metabolismo <i>in vivo</i> pelo suco gástrico e pancreático	18
4.2.4. Estudos de citotoxicidade nas células HepG2	19
4.2.5. Inibição de AChE e atividade antioxidante (DPPH)	19
4.2.6. Inibição da HMG-CoA reductase	20
5. Resultados e discussão	22
5.1. Composição química da infusão de “kiwi” por HPLC-DAD e LC-MS	22
5.2. Digestão <i>in vivo</i> das infusões por suco gástrico e pancreático.....	29
5.2.1. Digestão pelo suco gástrico.....	30
5.2.2. Digestão pelo suco pancreático	32
5.3. Estudo de toxicidade em linhas celulares.....	34

5.4. Atividade Antioxidante.....	35
5.5. Inibição de AChE	36
5.6. Interação das infusões com o fármaco com estatinas (Sinvastatina 10 mg)	37
6. Conclusão	40
8. Bibliografia	42

Índice de Figuras

Figura 1 – Colesterol	8
Figura 2 – Sinvastatina	10
Figura 3 – Reação de catálise de HMG-CoA	10
Figura 4 - Ácido salicílico	13
Figura 5 – Ácido cafeico	13
Figura 6 – Ácido p-cumárico	13
Figura 7 – Ácido clorogénico	13
Figura 8 – Ácido rosmarínico	14
Figura 9 - Cromatogramas das diferentes misturas comerciais obtidas por HPLC-DAD	23
Figura 10 - Espectro de UV-Vis para o pico 1 por LC-DAD (Tr: 10,60 minutos)	23
Figura 11 - Espectro de UV-Vis para o pico 2 por LC-DAD (Tr: 12,49 minutos)	24
Figura 12 - Espectro de UV-Vis para o pico 3 por LC-DAD (Tr: 13,24 minutos)	24
Figura 13 - Espectro típico de um ácido cafeico	24
Figura 14 - Espectro típico da Quercitina	25
Figura 15 - Espectro típico do Kamferol	25
Figura 16 - Espectro típico do Isorhamnetin	25
Figura 17 - Espectro de massa do pico de Tr: 11,80 minutos	26
Figura 18 - Espectro de massa MS2 do pico de Tr: 11,80 minutos	26
Figura 19 - Espectro de massa do pico de Tr: 13,85 minutos	27
Figura 20 - Espectro de massa MS2 do pico de Tr: 13,85 minutos	27
Figura 21 - Espectro de massa do pico de Tr: 15,58 minutos	28
Figura 22 - Espectro de massa MS2 do pico de Tr: 15,58 minutos	28
Figura 23 - Cromatograma da digestão pelo suco gástrico da mistura A, obtido por HPLC-DAD, para as 0 e 4 horas – 100%	30
Figura 24 - Cromatograma da digestão pelo suco gástrico da mistura B, obtido por HPLC-DAD para as 0 e 4 horas – Colesterolssil	30
Figura 25 - Cromatograma da digestão pelo suco gástrico da mistura C, obtido por HPLC-DAD, para as 0 e 4 horas - Diese	31

Figura 26 - Cromatograma da digestão pelo suco gástrico da infusão de folhas secas da árvore do “kiwi”, obtido por HPLC-DAD, para as 0 e 4 horas - “kiwi”	31
Figura 27 - Cromatograma da digestão pelo suco pancreático da mistura A, obtido por HPLC-DAD, para as 0 e 4 horas - 100%	32
Figura 28 - Cromatograma da digestão pelo suco pancreático da mistura B, obtido por HPLC-DAD, para as 0 e 4 horas – Colesterolssil	32
Figura 29 - Cromatograma da digestão pelo suco pancreático da mistura C, obtido por HPLC-DAD, para as 0 e 4 horas – Diese	33
Figura 30 - Cromatograma da digestão pelo suco pancreático da infusão de folhas secas da árvore do “kiwi”, obtido por HPLC-DAD, para as 0 e 4 horas - “kiwi”	33

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Composição das diferentes misturas obtidas para a diminuição dos níveis de colesterol.....	15
Tabela 2 – Lista de compostos e iões obtidos por LC-MS no modo negativo da infusão de folhas de “kiwi”	29
Tabela 3 – Tabela de resultados da inibição pelo método do DPPH para as quatro infusões..	34
Tabela 4 – Tabela de resultados da inibição por AChE para as quatro infusões.....	36
Tabela 5 – Valores de toxicidade celular do “kiwi” em comparação com infusões comerciais	37
Tabela 6 Percentagens de inibição e desvios-padrão do “kiwi” e das três infusões após ensaio de HMG-CoA reductase com o inibidor Sinvastatina	38

Índice de Quadros

Quadro 1 – Fatores capazes de influenciar a síntese e colesterol nos tecidos.....	9
--	----------

1. Introdução

As plantas têm sido utilizadas ao longo dos tempos com finalidades medicinais. De entre estas aplicações pode-se referir a prevenção/redução de problemas de aterosclerose, melhoria de estados de memória, bem como acelerador do trato digestivo.

Os níveis demasiado elevados de colesterol constituem um risco no que diz respeito a doenças cardiovasculares, estando associado a elevadas taxas destas mesmas doenças a nível europeu (Allender et al, 2008). Nem sempre se consegue reduzir o colesterol cortando nos alimentos que contêm elevados teores do mesmo, sendo portanto necessário recorrer a fármacos para reduzir os níveis de absorção do colesterol no organismo. Foram feitos estudos em que se demonstra que as infusões comerciais usadas para o colesterol diminuem o colesterol na corrente sanguínea, e que atuam através da redução da permeação do colesterol através da membrana das células Caco-2, utilizadas na simulação da barreira intestinal (Falé et al, 2014, submetido).

Com o aumento da informação nos dias de hoje, surge um grande impacto na sociedade provocado pelo uso de plantas e produtos naturais como agentes redutores dos níveis elevados de colesterol no organismo humano, uma das principais causas para o aparecimento de doenças cardiovasculares. Como tal, surge interesse em tentar compreender quais os compostos responsáveis por estas ações, e qual o mecanismo de atuação para que se possa inferir sobre a interação entre fármacos e toma em simultâneo com infusões utilizadas na redução, por exemplo, da hipercolesterolémia. Existem inúmeras espécies com elevado potencial terapêutico, sendo portanto, agentes a ter em conta, quando se fala de patologias, pois são de consumo fácil pela população em geral. No presente trabalho, as misturas herbais existentes no mercado e vendidas com sugestões sobre a diminuição do colesterol, vão ser analisadas. Alguns compostos fenólicos, que são geralmente os componentes maioritários das infusões e decocções (Falé et al 2013), mostraram influência no mecanismo de redução do colesterol, como seja a diminuição da absorção do colesterol

através barreira intestinal ou através da inibição da HMG-CoA reductase (Falé et al, 2014; Falé et al 2014; Leopoldini e al,2010).

As infusões são também muito utilizadas para aumentar o trânsito gastrointestinal. Esta ação pode ser devida ao aumento de motilidade do trato digestivo. As pequenas contrações musculares que ocorrem ao longo do aparelho digestivo estão relacionadas com a libertação de neurotransmissores, esta molécula é hidrolisada numa reação catalisada pelo enzima acetilcolinesterase. Inibindo este enzima pode-se aumentar as pequenas contrações da parede do tubo digestivo, aumentando assim a velocidade do trânsito gastro-intestinal. Caso os compostos existente nas infusões permeiem a barreira gastro-intestinal e hemato-encefálica poderão atuar no enzima localizado nas fendas sinápticas. Trabalhos anteriores (Falé et al, 2010) demonstraram que esta permeação pode ocorrer, verificando-se inibição da acetilcolinesterase no cérebro de animais de laboratório, podendo de algum modo justificar a ação das infusões na melhoria de doente com Doença de Alzheimer. Presentemente o processo utilizado para manter as pessoas mais ativas é precisamente a inibição do enzima acetilcolinesterase (Pepeu e Giovannini,2010).

Relacionado com doenças como a aterosclerose e a doença de Alzheimer estão os processos inflamatórios (Falé et al, 2010) com a formação de radicais que poderão levar à alteração estrutural de biomoléculas. Para contrariar a formação destes radicais, o organismo dispõe de antioxidantes endógenos, no entanto na própria dieta existem muitos compostos como os derivados fenólicos com propriedades antioxidantes, que poderão eventualmente impedir a formação de radicais nas moléculas biológicas.

Alguns dos fármacos apresentam algumas desvantagens. Devido a estes efeitos secundários, as pessoas procuram produtos naturais para combater as suas patologias (Falé et al, 2014, submetido). Os fármacos prescritos podem atuar de dois modos possíveis: inibindo a absorção intestinal do colesterol, como a ezetimiba que bloqueia os transportadores de NPLC1L1 (Allender et al, 2008; Falé et al, 2014, submetido), ou através da inibição biossintética do colesterol, como é o caso das estatinas que inibem a atividade da HMG-CoA (Garcia-Calvo et al, 2005).

Todos estes aspetos levaram à elaboração do presente estudo de modo a fornecer uma pequena contribuição para o conhecimento dos mecanismos moleculares subjacentes às atividades atribuídas pela utilização das plantas para fins medicinais.

2. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho são estudar o mecanismo molecular que possa justificar a ação de infusões de folhas de “kiwi” e de misturas de plantas comerciais na aceleração do trato digestivo; estudar a ação na diminuição de processos inflamatórios via atividade antioxidante; e por fim estudar o efeito da toma em simultâneo de infusões com fármacos utilizados na redução do colesterol na corrente sanguínea.

Para dar cumprimento a estes objetivos estabeleceram-se os seguintes objetivos parciais: a) Análise da composição química dos extratos de modo a se poder estabelecer uma relação estrutura-atividade; b) Inibição do enzima acetilcolinesterase de modo a contribuir para uma explicação do aumento da motilidade gastrointestinal; c) saber se a digestão poderá modificar as atividades biológicas encontradas inicialmente; d) estabelecer níveis de toxicidade celular; e) interação entre fármacos e “chá”s durante uma toma em simultâneo na inibição do enzima HMGR, alvo terapêutico de estatinas.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Doenças do Sistema Colinérgico

Informações produzidas a partir de estudos do sistema da transmissão colinérgica, entre neurónios ou no sistema neuromuscular, podem auxiliar o desenvolvimento de medicamentos mais específicos para o tratamento do Alzheimer, ou para ajudar na motilidade do trato-gastro intestinal. A acetilcolina (ACh) é um mediador químico de sinapses no Sistema Nervoso Central, no Sistema Nervoso Periférico e também na junção neuromuscular. A acetilcolina, os seus recetores e o conjunto enzimático responsável pela sua síntese e degradação, constituem o sistema colinérgico. O conhecimento deste sistema, principalmente das vias de sinalização celular que se iniciam pela ativação os recetores colinérgicos, tem sido utilizado no desenvolvimento de novos tratamentos para patologias neurológicas e psiquiátricas. Nestas patologias verifica-se uma disfunção do sistema de neuro-transmissão colinérgica, como por exemplo, transtornos de humor e alguns tipos de esquizofrenia (Ventura et al, 2009).

Os inibidores de AChE permitem o aumento nos níveis cerebrais e nas junções neuromusculares de acetilcolina, podendo ser usados para aliviar quer os sintomas de Alzheimer, quer a motilidade gastrointestinal (Ventura et al, 2009).

O sistema colinérgico caracteriza-se pela presença de variadas enzimas bem como de neurotransmissores, butirilcolina e acetilcolina, sendo a última sintetizada a partir de acetil-CoA e a colina pela acetiltransferase. A colina presente no SNC é transportada pela circulação sanguínea após os precursores (glicerofosfocolina, fosforilcolina e fosfatidilcolina) a terem originado (Hirota et al, 2006). A colina pode ser obtida a partir de outras fontes, sendo recaptada após a sua libertação e degradação da acetilcolina, sendo armazenada em vesículas sinápticas no interior do neurónio pré-sináptico ou na junção neuromuscular. O ciclo de vida da acetilcolina começa com o aumento da sua concentração no interior da vesícula, sendo depois libertação por exocitose para a fenda sináptica ou neuromuscular, e finalmente, liga-se aos recetores colinérgicos. Quando ocorre a ligação, o seu efeito é desencadeado

e ela é hidrolisada na fenda sináptica numa reação catalisada pelo enzima AChE em colina e acetato, e a colina pode ser novamente recaptada, iniciando-se assim, um novo ciclo (Hirota et al, 2006; Ferreira et al, 2009).

O trato intestinal é capaz de se autorregular através de hormonas produzidas e neurotransmissores do sistema nervoso vegetativo (simpático ou parassimpático). Estas hormonas e neurotransmissores estão sempre em contínua interação, estimulando ou inibindo as funções digestivas: função hepática, pancreática ou regulação da motilidade intestinal. Uma vez que este sistema apresenta alguma importância para o normal funcionamento do aparelho digestivo, algumas plantas podem ter ação sobre ele, melhorando o seu funcionamento (Cunha et al, 2010).

Os inibidores da acetilcolinesterase podem ser utilizados para aumentar a motilidade intestinal, uma vez que a acetilcolinesterase é o neurotransmissor excitatório responsável pelas contrações peristálticas (Holzer and Maggi, 1994). A acetilcolina é responsável por controlar o transporte iónico nas células do epitélio intestinal, e portanto, a secreção de água para hidratação intestinal (Hirota and McKay, 2006). A hidratação intestinal é importante para estabelecer um ambiente aquoso propício para a digestão enzimática e para a absorção de nutrientes, bem como para fornecer uma superfície lubrificada para a passagem dos alimentos através das contrações peristálticas (Garcia-Calvo et al, 2005). Das várias condições médicas que podem estar associadas à fraca motilidade intestinal, a dor abdominal, vômitos, prisão de ventre, entre outras (Falé et al, 2013).

3.2. Doenças Cardiovasculares

Doenças coronárias como a hipercolesterolemia, são doenças das sociedades modernas. Estas doenças caracterizam-se por níveis elevados de colesterol, principalmente o ligado a proteínas de baixo peso molecular, como as LDL, formando LDL-C. A diminuição dos níveis de LDL-C plasmático parece uma solução lógica para a redução da incidência das doenças coronárias, através da redução ou até mesmo reversão do desenvolvimento de aterosclerose

coronária. Existem inúmeros fármacos disponíveis para tratar estes sintomas, sendo um dos principais os que inibem o HMG-CoA reductase, enzima chave na biossíntese do colesterol (Corsini et al, 1995).Atualmente existem inúmeros trabalhos de investigação que incidem em moléculas que atuam na síntese do colesterol, ou seja, as Estatinas, inibindo-a.

3.2.1. Colesterol: biossíntese e inibição

O colesterol, Figura 1, é um componente fundamental dos tecidos, uma vez que este entra na constituição e todas as membranas celulares e é um precursor essencial na síntese de hormonas, vitaminas, esteroides e ácidos biliares. O colesterol pode entrar no organismo de dois modos, apresentados seguidamente. O primeiro é através da dieta, por absorção. Todo o colesterol que se encontra na dieta está na sua forma esterificada e é hidrolisado a colesterol livre através do enzima colesteril esterase (enzima pancreática) (Site FFUP,14-4-2014,10h30). O segundo é através da biossíntese da própria molécula, sendo sintetizado pelos tecidos humanos. O colesterol é sintetizado a partir de acetil CoA (que pode derivar de ácidos gordos, de aminoácidos ou de hidratos de carbono). O fígado é o principal local de síntese do colesterol, mas este também pode ser sintetizado pelo intestino ou por glândulas que produzem hormonas esteroides (como por exemplo, o córtex adrenal, ao testículos e os ovários). Todas as reações biossintéticas ocorrem no citoplasma celular, mas alguns enzimas necessários estão ligados às membranas do reticulo endoplasmático (Berg et al, 2002).

A síntese e a utilização do colesterol deve ser estreitamente regulada de modo a prevenir a sua acumulação em excesso no organismo, uma vez que estes excessos aumentam o risco de doenças cardiovasculares, por deposição do colesterol nas artérias coronárias.

O colesterol é sintetizado a partir de Acetil-CoA. Esta é derivada de uma reação de oxidação (de por exemplo, ácidos gordos ou piruvato), que ocorre na mitocôndria e é transportada para o citoplasma. Todas as reações de redução na biossíntese do colesterol utilizam NADPH como cofator. Os isoprenoídes

intermediários envolvidos na síntese do colesterol são derivados de outras reações de síntese ocorrentes no organismo. A síntese envolve então cinco passos importantes: conversão de Acetil-CoA em HMG-CoA; conversão de HMG-CoA em mevalonato; conversão do mevalonato numa molécula de isopreno (IPP) com perda de CO_2 ; conversão da molécula de IPP em esqualeno, e finalmente, o esqualeno é convertido em colesterol (Liscum et al, 4th Edition).

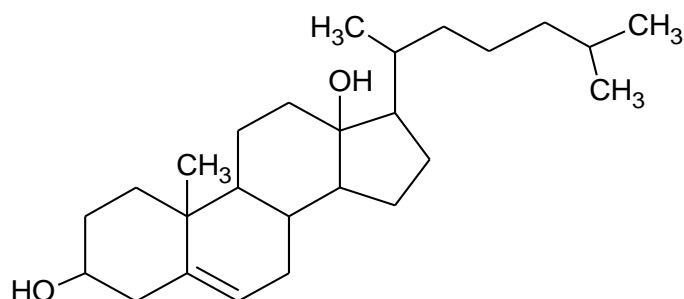


Figura 1 – Colesterol. Fonte: Desenhado a partir do ChemSketch.

O equilíbrio do colesterol no organismo resulta da estreita ligação entre a síntese e a absorção do colesterol como substrato biológico e a excreção biliar. Assim, quando aumenta a sua excreção ou diminui a sua absorção, por exemplo, aumenta a síntese endógena de colesterol; pelo contrário a maior chegada ou acumulação de colesterol nos tecidos, leva à inibição a sua síntese (Site FFUP,14-4-2014,10h30).

O ponto principal de limitação e do controlo no metabolismo intracelular de colesterol, dá-se na fase e formação do mevalonato a partir de HMG-CoA, e é largamente influenciado pelo grau de atividade enzimática da HMG-CoA reductase, glicoproteína do retículo endoplasmático da célula e local de acumulação farmacológica das estatinas (Site FFUP,14-4-2014,10h30). Alguns dos fatores que podem influenciar a síntese de colesterol nos tecidos podem ser vistos no Quadro 1, abaixo.

Quadro 1 – Fatores capazes e influenciar a síntese de colesterol nos tecidos. Nota da figura: O glucagom é utilizado para o tratamento de doenças endócrinas, como o caso da Diabetes. Funciona como antidiabético (Stancu et al, 2001).

Aumentam a síntese	Diminuem a síntese
Má absorção de colesterol	Colesterol da dieta
Interrupção da circulação entero-hepática	Hormonas: glucocorticóides e glucagom
Hormonas: insulina, tiroxina, e catecolaminas	Inibidores da HMG-CoA (estatinas)
Fenobarbitona	Clofibrato
Escuridão	Ácido nicotínico
	Luminosidade

As estatinas são substâncias que têm a capacidade de inibir a síntese do colesterol endocelular, por competição com o substrato do enzima HMG-CoA reductase, impedindo a formação de HMG-CoA em ácido mevalónico. Devido à redução do colesterol celular, há um estímulo a nível da membrana celular para a produção de recetores para o LDL (Osswald 4ª Edição; Hardman et al, 2001).

A eficácia das Estatinas em reduzir os níveis do “mau colesterol” é bastante significativa. A longo prazo, a redução dos níveis de colesterol resulta numa diminuição na incidência de doenças degenerativas, principalmente aquelas que são resultado dos níveis elevados de colesterol no sangue, como a arteriosclerose, a obstrução das artérias do coração, rins, cérebro e da circulação das pernas, intestinos e vasos genitais (Scandinavian Simvastatin Survival Study, Group 1994; Treasure et al, 1995).

Mesmo sendo as estatinas medicamentos com eficácia não deixam de ter riscos, por vezes até fatais. Por esta razão devem ser medicamentos apenas tomados sob orientação e acompanhamento médico, os pacientes devem ser mantidos sob severa vigilância (Osswald 4ª Edição; Hardman et al, 2001; Rang et al; 4th Edition). A simvastatina, Figura 2, pertence à classe de fármacos dos Antidislipídicos, onde se incluem as Estatinas, sendo um fármaco comumente prescrito para o tratamento da hipercolesterolémia (Site do Infarmed, 29-4-2014, 21h32). Por isso, a pesquisa de novos inibidores deste

enzima continua, sendo muito atual a procura de inibidores de origem natural, que possam não ter efeitos secundários, nos níveis normalmente consumidos.

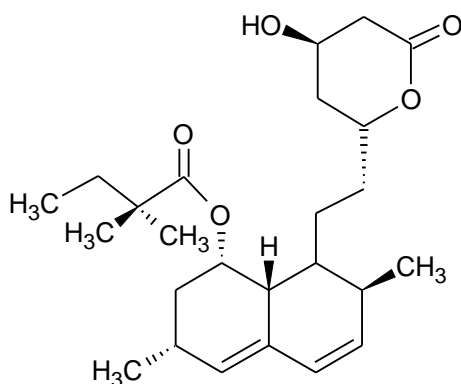


Figura 2 – Sinvastatina. Fonte: Desenhado a partir do ChemSketch.

3.2.2. HMG-CoA reductase

A HMG-CoA reductase, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductase, é uma glicoproteína transmembranar, localizada no retículo endoplasmático. Esta enzima catalisa a redução do HMG-CoA a coenzima A e mevalonato. Controlar os níveis séricos de colesterol é bastante importante na terapêutica, uma vez que a hipercolesterolémia leva frequentemente ao desenvolvimento de outras doenças como seja a aterosclerose e consequentemente, ao aparecimento de doenças coronárias que resultam no enfarte do miocárdio e ataque cardíaco (Technical bulletin of HMG-CoA reductase Kit, CS1090).

A reação química correspondente à catálise de HMG-CoA em mevalonato e CoA, também envolvida na síntese do colesterol, é a seguinte (Figura 3):



Figura 3 – Reação de catálise de HMG-CoA. Fonte: Desenhado a partir do ChemDraw11.

3.3. Atividade antioxidante e processos inflamatórios

O *stress* oxidativo corresponde a um desequilíbrio entre a taxa de produção de agentes oxidantes e sua degradação. Ocorre quando a produção de radicais livres está acelerada ou quando os mecanismos envolvidos na proteção encontram-se deteriorados. Predisposição genética, fatores ambientais como radiação UV e propriedades intrínsecas específicas de grupos celulares, podem exacerbar o dano oxidativo ou diminuir a capacidade das células de degradar estes agentes agressores (GIASSON *et al.*, 2002).

É geralmente aceite que os radicais livres desempenham um papel importante no desenvolvimento da lesão tecidual (inflamações) e eventos patológicos em organismos vivos (RIVELLI *et al.*, 2007). Acredita-se que as doenças degenerativas crónicas, como doença de Alzheimer, aterosclerose, o envelhecimento precoce, entre outras, estejam relacionadas com o *stress* oxidativo (SORG, 2004).

O envelhecimento humano é um fenómeno complexo e muitas teorias foram sugeridas para explicar esse processo como a teoria baseada no *stress* oxidativo, onde existe desequilíbrio causado quando as defesas antioxidantes estão quantitativa ou qualitativamente impossibilitadas de neutralizar a produção e os efeitos de moléculas oxidantes, ocasionando danos em biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA, que vão se acumulando ao longo dos anos, produzindo danos celulares e teciduais, resultando no envelhecimento do organismo (PANZIERA *et al.*, 2011).

O uso de antioxidantes têm sido uma prática corrente nos dias de hoje para tentar melhorar os sintomas destas patologias. Os agentes denominados antioxidantes, são também conhecidos como radicais livres, e são os responsáveis pelo *stress* oxidativo a nível celular. Estes são átomos de hidrogénio com um protão e um só eletrão. Como tal são espécies de oxigénio reativas, ou seja, são espécies onde o eletrão desemparelhado se encontra no oxigénio, como por exemplo, o caso do hidroxilo (OH•). Pode ocorrer o mesmo para compostos azotados, como é o caso do óxido nítrico (NO•) (Wang *et al.*, 2011).

Este método possui algumas vantagens face a outros: é fácil de reproduzir, seguro, possuiu uma boa reprodutibilidade, e é bastante utilizado para este tipo

e ensaios. A quantidade de sinal produzido por este método depende de vários fatores, como sejam a concentração de MTT (nas quantidades erradas pode ser tóxico para as células), o tempo de incubação das células com o MTT, o número de células viáveis e a sua atividade metabólica. Estes parâmetros devem ser tomados em atenção, de forma a otimizar o ensaio e a obter melhores resultados (MTT cell proliferation assay, ATCC; Riss et al, Cell viability assays). Como todos os métodos, este também possui algumas limitações. Nomeadamente, este pode ser afetado por pH ácido, por polifenóis, análogos de piruvato e nano-materiais (Wang et al, 2011).

3.4. Compostos Fenólicos

Os polifenóis são componentes resultantes do metabolismo secundário e são caracterizados pelos seus anéis aromáticos hidroxilados com uma cadeia lateral variável e são micronutrientes abundantes na nossa dieta, e são importantes pelo seu papel na prevenção de doenças degenerativas, como as doenças cardiovasculares, e pelas suas propriedades antioxidantes (Pinto et al, 2010; Manach et al, 2004). Estas moléculas são metabolitos secundários das plantas e estão geralmente envolvidos na defesa das mesmas contra radiação ultravioleta ou agressão por agentes patogénicos (Manach et al, 2004; Samuelsson et al, 2004; Cunha et al, 2010).

Os compostos fenólicos, como compostos químicos, podem ser obtidos por duas vias: a do acetato e a do xiquimato (Manach et al, 2004; Rice Evans et al, 1996). Os polifenóis dividem-se em subgrupos como sejam os ácidos fenólicos, sendo estes mais abundantes e distinguindo-se em derivados do ácido benzóico, sendo exemplos o ácido salicílico, e em derivados de ácido cinâmico, sendo exemplo o ácido cafeico (quando combinado com ácido quínico, origina o ácido clorogénico), ácido cumárico, bem como o ácido clorogénico e o ácido rosmarínico que se encontram na forma de ésteres e álcoois (Manach et al, 2004; Rice Evans et al, 1996). Existem ainda outros grupos, como os flavonóides, os estilbenos e os linhanos. Algumas estruturas podem ser exemplificadas abaixo (figura 4 a 8).

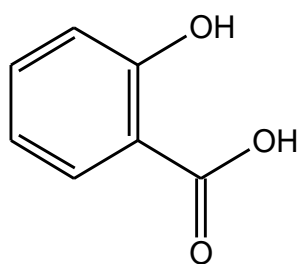


Figura 4 - Ácido salicílico. Fonte: Desenhado a partir do ChemSketch.

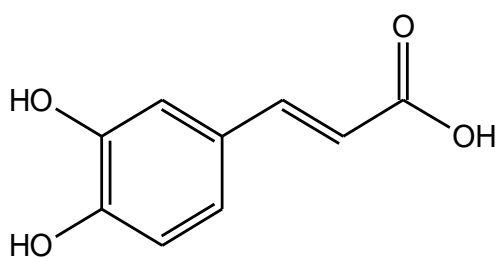


Figura 5 – Ácido cafeico. Fonte: Desenhado a partir do ChemSketch.

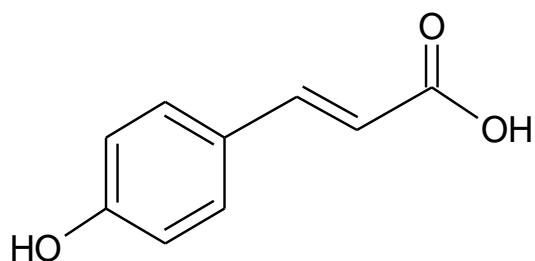


Figura 6 – Ácido p-cumárico. Fonte: Desenhado a partir do ChemSketch.

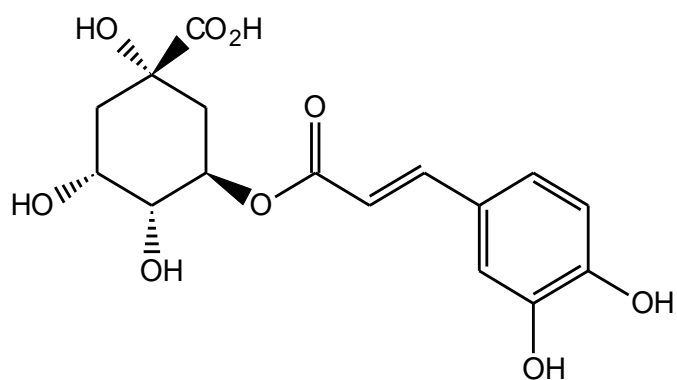


Figura 7 – Ácido clorogénico. Fonte: Desenhado a partir do ChemSketch.

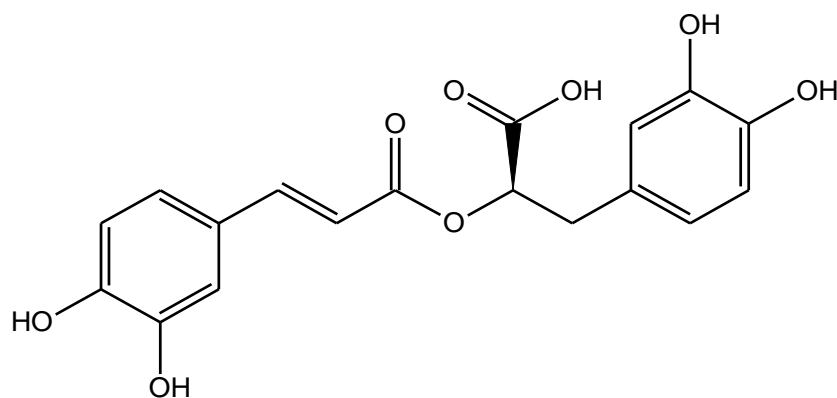


Figura 8 – Ácido rosmarínico. Fonte: Desenhado a partir do ChemSketch.

O ácido cafeico é geralmente o composto mais abundante dos ácidos fenólicos (cerca de 75 a 100%) do teor total de ácidos hidroxicinâmicos em frutas. Apesar de se encontrar maioritariamente na fruta, este pode ser encontrado noutras partes da plantas, e a sua concentração diminuir durante a preparação da parte em questão (Manach et al, 2004). Os flavonóides apresentam características que também os tornam interessantes, como sejam, propriedades anti-inflamatória, antialérgicas, e ainda podem diminuir o risco de doenças cardíacas por inibição da oxidação da LDL. Os flavonóides estão sempre presentes nos alimentos, e os seus compostos representativos são a quercetina e o canferol, e estão geralmente presentes em quantidades muito pequenas. A maior parte dos flavonoides da dieta encontram-se em “chá”s, e também estão envolvidos na redução do risco de contração de doenças coronárias (Falé et al, 2013). Dentro este grupo existem ainda as flavonas, que são menos comuns que os flavonoides. Estas consistem em glicósidos da luteolina e apigenina (Manach et al, 2004).

4. Procedimento experimental

4.1. Materiais

4.1.1. Material vegetal e Preparação de extratos

As três misturas comerciais (A, B e C) para a diminuição dos níveis de colesterol foram obtidas em diferentes locais. A sua composição é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – composição das diferentes misturas obtidas para a diminuição dos níveis de colesterol.

Infusão	Composição		%
A	Cavalinha	<i>Equisetum arvense L.</i>	30
	Oliveira (folhas)	<i>Olea europaea</i>	30
	Espinheiro alvar (fruto)	<i>Crataegus monogyna Jacq.</i>	20
	Hortelã-Pimenta	<i>Mentha piperita</i>	20
B	Cavalinha	<i>Equisetum arvense L.</i>	20
	Chicoria	<i>Cichorium intybus L.</i>	20
	Salgueiro branco (casca)	<i>Salix alba L.</i>	20
	Alfavaca	<i>Parietaria officinalis L.</i>	15
	Sargacinha	<i>Lithospermum diffusum Lag.</i>	15
	Urtiga branca	<i>Lamium album L.</i>	15
C	Cavalinha	<i>Equisetum arvense L.</i>	30
	Espinheiro branco (flor)	<i>Crataegus monogyna Jacq.</i>	25
	Urtiga verde	<i>Urtica dioica</i>	25
	Canela (casca)	<i>Cinnamomum</i>	20

Analizou-se também a folha de planta do “kiwi”, *Actinidea deliciosa*, pertencente à família dos *Actinidaceae*s, recolhida na região da Beira Baixa em Abril de 2014 (esta planta está para obtenção de número de catalogação/classificação, Voucher, na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa).

4.1.2. Reagentes

Todos os compostos químicos utilizados foram de gradiente analítico. MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-1-il]-2,5-difenil-tetrazólico), o *kit* de HMG-CoA, a pepsina e a pancreatina foram obtidos da Sigma (Barcelona, Espanha). O DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), glutamina, Pen-Strep (penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 U/ml), tripsina, PBS (tampão de sais fosfato), HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) e FBS (*Fetum Bovine Serum*) foram adquiridos à Lonza®. A água para o HPLC (Millipore), o metanol e o TFA foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

4.1.3. Linhas celulares

A linha celular utilizada foi HepG2, linha de células epiteliais do fígado, ATCC (ATCC#HT8065). A linha foi cultivada em DMEM suplementado com 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina a 37° numa atmosfera de 5% de CO₂.

4.1.4. Equipamento

Para os procedimentos essenciais foram usados um Heto® PowerDry 3000, para liofilizar as amostras, uma centrífugadora Mini Spin F45-12-11 da Eppendorf®.

A análise por HPLC-DAD foi realizada num VWR-Hitachi LaChrom Elite® equipado com uma coluna LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-8 (5µm)

(Merck) e software EZChrom Elite® (Agilent Technologies 2007), com injetor automático e detecção por sistema de «Diode array». A análise por LC-MS e LC-MS/MS foi efetuada num cromatógrafo líquido com sistema Surveyor Plus Modular LC acoplado a um espectrómetro de “armadilha de iões” (ion trap) LCQ Duo equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) da Thermo Scientific (bremen, Germany). A coluna usada foi a LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-8 (5µm) (Merck, Alemanha). Para a espectrofotometria usou-se um espectrofotómetro M350 Double Beam UV-Vis Spectrophotometer.

4.2. Métodos

4.2.1. Preparação de extratos

Foram preparadas infusões de folhas de *A. Deliciosa* (folha da árvore do “kiwi”) e das três misturas comerciais obtidas. A infusão de *A. Deliciosa* foi preparada com a pesagem de 10 g de folhas secas, e depois foi preparada a infusão com 100ml de água destilada. As infusões comerciais foram preparadas usando 5 saquetas das embalagens de “chá” e preparadas em 200 ml de água destilada a ferver durante 10 minutos. Deixou-se arrefecer o preparado e foram filtradas com papel de filtro nº1 da Whatman e foram posteriormente liofilizadas. Foram obtidas 123 mg/g, 100.6 mg/g, 134.8 mg/g e 115.5 mg/g para o “kiwi” e para as misturas A, B e C respetivamente (Falé *et al.*, 2014).

4.2.2. Análise de extratos por HPLC-DAD e LC-MS

A análise por HPLC foi realizada através de uma eluição por gradiente, composto por uma solução A (metanol) e uma solução B (TFA 0.05% em água MiliQ) com o seguinte método: 0 minutos – 20% de A e 80% de B; 20 minutos – 80% de A e 20% de B; 25 minutos – 80% de A e 20% de B; 28 minutos – 20% de A e 80% de B; 30 minutos – 20% de A e 80% de B para as três infusões. Para ambas foi usado um fluxo de 1 ml/min e injetados de 25 µl das soluções de 1 mg/ml de cada uma das infusões. A deteção foi feita entre os 200 e os 500 nm

com um DAD. Para a quantificação do colesterol foram injetados 25 µl das amostras num sistema isocrático composto por metanol (50%) e acetonitrilo (50%), com um fluxo de 1 ml/min durante 15 minutos, e a deteção foi feita a 210 nm (Falé *et al.*, 2014).

A análise por LC-MS e LC-MS/MS foi feita com uma injeção de 25 µl de cada amostra, de soluções previamente preparadas de 10 mg/ml de cada infusão. Foi usado um gradiente linear composto por uma solução A (1,0% e ácido fórmico) e uma solução B (metanol) com o seguinte método: 0 minutos – 70% de A e 30% e B; 20 minutos – 20% de A e 80% e B; 25 minutos – 80% de A e 20% e B. no espectrómetro de massa foram usados os modos de iões positivo e negativo na gama de m/z de 120-1000 e os parâmetros foram ajustados com vista a otimizar a relação sinal/ruído (S/N) para os iões de interesse. Os fluxos do nebulizador e do gás auxiliar (nitrogénio) foram de 40 e 20 (unidades arbitrárias) e a temperatura capilar foi estabelecida nos 250°C. Para a aquisição de dados e análise dos espectros foi o usado o *software* Xcalibur™ ad Thermo Scientific (Falé *et al.*, 2014).

4.2.3. Metabolismo *in vivo* pelo suco gástrico e pancreático

Este ensaio foi adaptado de Falé *et al.* (2013). Resumindo, 2,5 ml de suco gástrico e de pancreático foram adicionados a 2,5 ml de solução de extrato das infusões com a concentração de 20 mg/ml (cada um em separado). A mistura foi deixada a incubar a 37°C durante 4 horas. 100 µl de amostra foi recolhido a cada hora e adicionado a 900 µl de metanol, e centrifugadas durante 5 minutos a 5000g. O sobrenadante recolhido foi analisado por HPLC. No controlo substituiu-se o extrato por um volume igual ao da amostra em água destilada. Os ensaios foram feito em triplicado. O suco gástrico (100 ml) consistia em 320 mg de pepsina, 200 mg de NaCl em HCl (pH=1,2). O suco pancreático (100 ml) consistia numa solução de 250 mg de pancreatina em 10 ml de tampão sódio-fosfato 50 mM a pH 8.

4.2.4. Estudos de citotoxicidade nas células HepG2

As células HepG2, linha de células epiteliais do fígado (ATCC#HT8065), foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomicina e 2 mM de L-Glutamina, a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂. Foram feitas passagens das células HepG2 a cada 48 e 72 horas antes de o frasco atingir a sua máxima confluência (Falé *et al.*, 2014).

Os estudos de citotoxicidade foram realizados em microplacas de 96 poços, expondo as células 2 horas a diferentes concentrações de extrato das três infusões em meio de cultura, e foram usados os testes de viabilidade do MTT. A média e o desvio padrão foram calculados de 3x8 replicados para cada concentração (Falé *et al.*, 2014).

4.2.5. Inibição de AChE e atividade antioxidante (DPPH)

A atividade enzimática da acetilcolinesterase foi medida usando o seguinte método: 350/325 µl de solução tampão TRIS sem sais (ph 8,0), 100 µl de amostra (extrato das três infusões liofilizadas), e 25 µl da solução de acetilcolinesterase (0,5 u/ml) foram pipetados para uma *cuvette* e deixados a incubar durante 15 minutos. Após os 15 minutos, foram pipetados 475 µl de DTNB e 75 µl do substrato (solução de AChI). Foi lida a absorvência a 405 nm durante 4 minutos em intervalos de 30 segundos, contra um branco. Foi calculada a velocidade da reação. Efetuou-se também um controlo desta reação, em que a amostra foi substituída por água destilada, considerando-se este ensaio como o ensaio em que se regista atividade máxima, ou seja, 100%. O ensaio foi efetuado em triplicado para cada concentração das três amostras. Os cálculos foram efetuados da seguinte maneira:

$$\text{Atividade final} = (V_{\text{declive da amostra}} / V_{\text{declive médio da referência}})$$

$$\text{Inibição (\%)} = 100 - (100 \times V_{\text{atividade final}})$$

Estes cálculos foram baseados numa regressão linear onde foi possível verificar a inibição (%) em função da concentração de extrato.

A atividade antioxidante dos extratos foi realizada através do método do DPPH, onde foram adicionados 10 µl de extrato de cada amostra a 1 ml de solução de DPPH (100 ml de metanol + 2 mg de DPPH). Deixou-se a incubar durante 30 minutos e depois foram lidas as absorvências a 517 nm, contra um branco de metanol. O ensaio do controlo foi efetuado substituindo a amostra por água destilada, sendo que este ensaio foi considerado o ensaio onde se registou a atividade máxima, ou seja, 100%. Os cálculos foram efetuados da seguinte maneira:

$$\text{Atividade antioxidante} = 100 - (A_{\text{controlo}} / A_{\text{amostra}}) \times 100$$

Em que A representa a absorvência. Este ensaio foi também realizado e triplicados. Estes cálculos foram baseados numa regressão linear onde foi possível verificar a atividade antioxidante em função da concentração de extrato

4.2.6. Inibição da HMG-CoA reductase

O estudo da inibição do HMG-CoA reductase foi efetuado através e um *kit* da Sigma (Barcelona, Espanha). O *kit* era composto pelos seguintes elementos: solução tampão (10 ml, concentrada 5x), NADPH (25 mg), solução de substrato (HMG-CoA, 2 ml), HMG-CoA reductase (200 µl) e uma solução de inibidor (200 µl).

Foram feitos duplicados de cada extrato a diferentes concentrações, 100, 200 e 400 µg e do controlo. Dilui-se a solução tampão de modo a ficar 1x concentrada em água MilliQ (0,2 ml de solução tampão para 0,8 ml de água MilliQ). Ressuspendeu-se o NADPH em 1,5 ml de solução tampão concentrado

1x. O HMG-CoA reductase foi usada diretamente do *kit* sem diluições. Os reagentes foram colocados, pela seguinte ordem, num eppendorf, para a fazer a reação: 900 µl de tampão, 10 µl do inibidor extrato, 25 µl e NADPH, 60 µl de HMG-CoA reductase e 5 µl de HMGR (enzima). As amostras foram recolhidas aos tempos 0, 1, 2, 4 e 6 minutos e retiraram-se 500 µl da reação para juntar a 500 µl de metanol num *vial* (o metanol foi usado para parar a reação). A cinética para seguir o decaimento do NADPH foi seguida pelo sistema HPLC-DAD, e o comprimento de onda de interesse foi de 340 nm [45].

Para os ensaios realizados com o fármaco Sinvastatina e os extratos, o procedimento foi semelhante, mas como se utilizaram dois inibidores, a reação foi feita com as seguintes quantidades: 890 µl de tampão, 10 µl do inibidor (Sinvastatina), 10 µl extrato (segundo inibidor), 25 µl e NADPH, 60 µl de HMG-CoA reductase e 5 µl de HMGR (enzima). O restante procedimento foi igual.

4.3. Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi feita recorrendo ao Microsoft® Excel 2013, com resultados expresso em média±desvio padrão. A análise dos espectros e massa foram feitas recorrendo ao Xcalibur®.

5. Resultados e discussão

Neste trabalho utilizaram-se folhas de *A. Deliciosa* e “chá”s comerciais para estudar a capacidade antioxidante, inibitória do enzima AChE e ainda o efeito destes “chá”s quando tomados em simultâneo com Estatinas utilizadas para a redução do colesterol na corrente sanguínea. Os “chá”s comerciais tinham já sido estudados anteriormente (Falé *et al.*, 2014) havendo indicação de que apresentavam atividade inibitória do enzima HMG-CoA reductase, atuando portanto de modo semelhante a Estatinas.

Para se poder relacionar a atividade biológica dos «chá”s» com a composição química, procedeu-se em primeiro lugar à identificação de alguns dos compostos existentes no extrato aquoso de folhas de “kiwi”, uma vez que a identificação dos “chá”s das misturas comerciais se encontra no trabalho de Falé *et.al* (2014). A identificação dos compostos maioritários existentes no extrato de folhas de *A. Deliciosa* são apresentados no subcapítulo 5.1. Após a ingestão destes “chá”s é importante conhecer o comportamento do suco digestivo sobre a composição química, eventuais alterações de atividade biológica, e toxicidade, resultados apresentado em 5.2 e 5.3, respetivamente.

Os resultados dos estudos de atividade biológica, atividade antioxidante, inibitória de acetilcolinesterase e inibição de HMG-CoA reductase em conjunto com sinvastatina encontram-se nos subcapítulo 5.4, 5.5 e 5.6, respetivamente.

5.1. Composição química da infusão de “kiwi” por HPLC-DAD e LC-MS

Foi analisada a infusão de folhas de *A. Deliciosa* com vista à identificação dos compostos maioritários, que pudessem justificar a sua atividade biológica. O cromatograma obtido encontra-se na Figura 9. Verifica-se a existência de 4 compostos após a zona do sinal de injeção (tr entre 2-3 min), tendo sido identificado 3 deles, cuja numeração se indica na Figura 9.

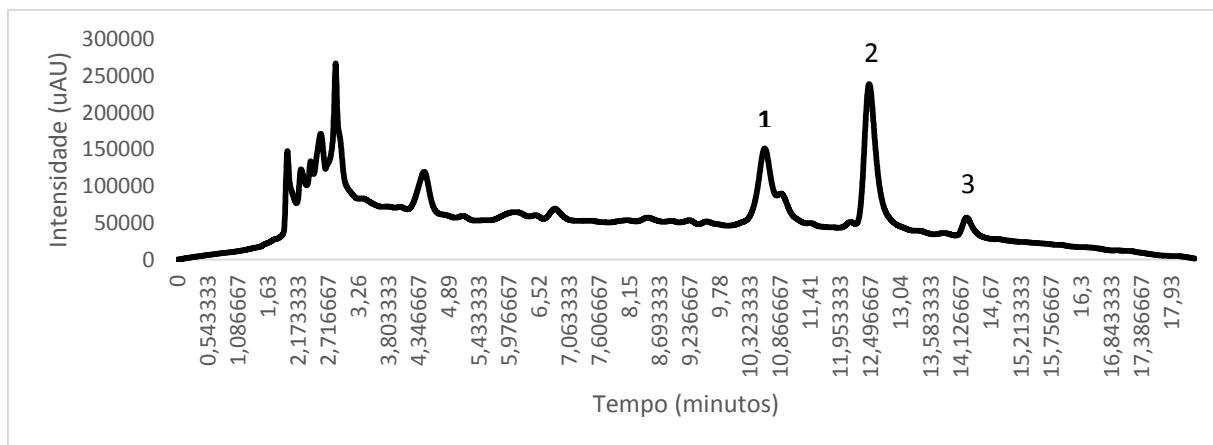


Figura 9 - Cromatograma da infusão de “kiwi” obtido por HPLC-DAD.

Para facilitar a identificação dos compostos por espectrometria de massa foram feitos os espectros de UV-Vis dos compostos (1-3). Os espectros de UV-Vis destes compostos encontram-se na Figura 10 a 12. Para se poder fazer uma primeira distinção na estrutura química dos compostos, pesquisaram-se espectros de UV-Vis de derivados de ácido cafeico e flavonóides como quercetina, isorramnetina e canferol. Os espectros encontram-se na Figuras 13 a 16. Por comparação com os espectros dos compostos existentes no extrato de “kiwi”, verifica-se que estes compostos não são derivados de ácido cafeico, mas antes derivados de flavonoides.

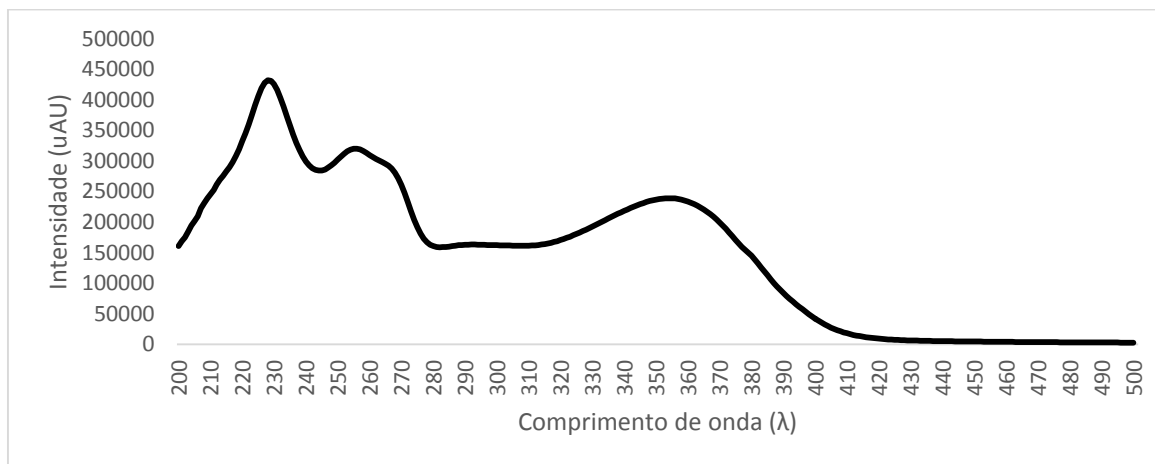


Figura 10 – Espectro de UV-Vis para o pico 1 por LC-DAD (tr: 10,60 minutos).

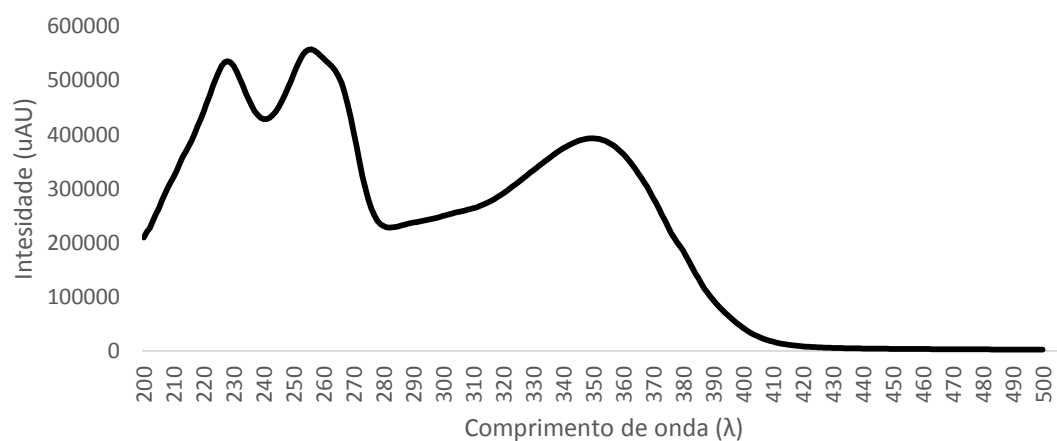


Figura 11 – Espectro de UV-Vis para o pico 2 por LC-DAD (Tr: 12,49 minutos).

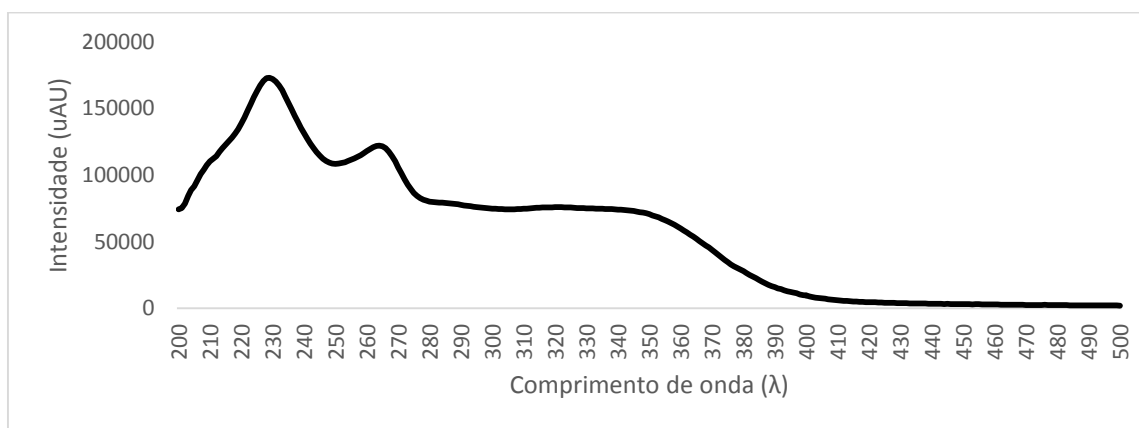


Figura 12 – Espectro de UV-Vis para o pico 3 por LC-DAD (Tr: 14,24 minutos).

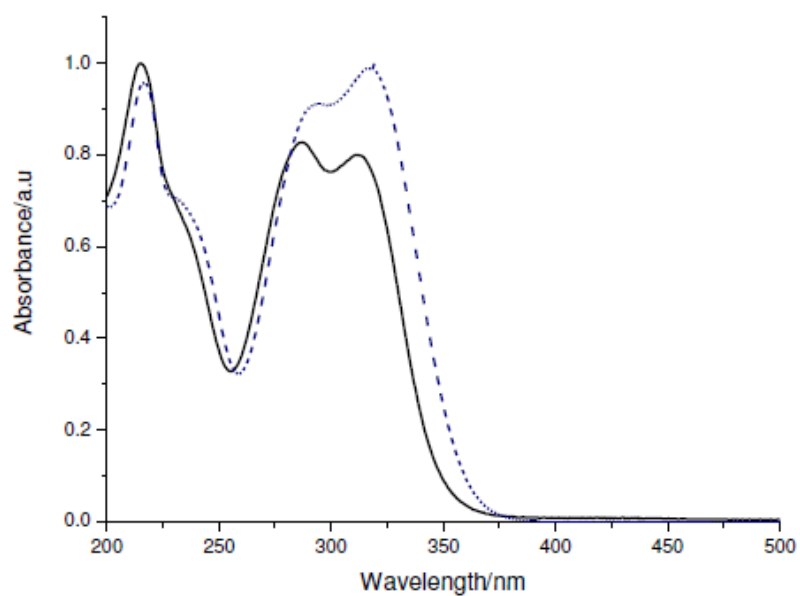


Figura 13 – Espectro típico de um ácido cafeico (Belay et al, 2012).

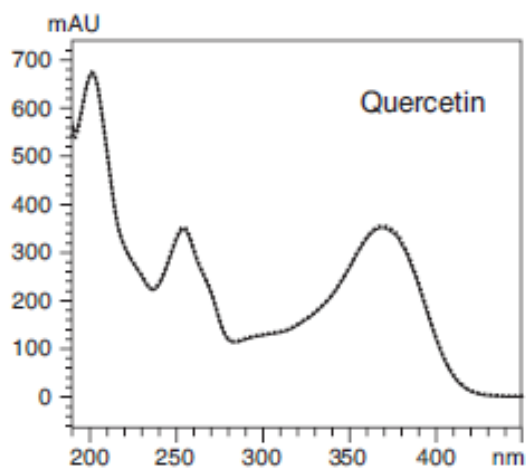


Figura 14 – Espectro típico da Quercitina (Analysis of flavonoids in ginkgo biloba extract, No.L405)

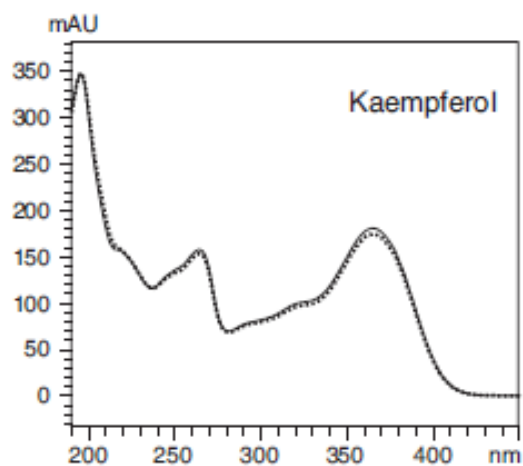


Figura 15 – Espectro típico do canferol (Analysis of flavonoids in ginkgo biloba extract, No.L405).

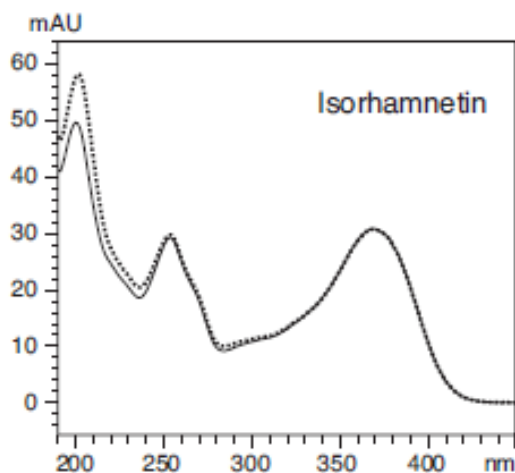


Figura 16 – Espectro típico da isorramnetina Quercitina (Analysis of flavonoids in ginkgo biloba extract, No.L405).

Comparando os espectros de UV-Vis do espectro de “kiwi” para cada pico (Figuras 10 a 12) com os espectros dos padrões de flavonoides (Figuras 14 a 16), podemos concluir que os compostos maioritários da planta de “kiwi” são do tipo flavonóides.

Procedeu-se ao estudo dos espectros de massa destes compostos, já com a indicação de que deveriam ser flavonóides. Os espectros de massa encontram-se nas Figuras 17 a 19. São também apresentados os espectros MS2 nas Figuras 20 a 22.

Kiwi_14Mai_LCMS_neg_01 #462 RT: 11,80 AV: 1 NL: 8,10E5
F: - c ESI Full ms [150,00-2000,00]

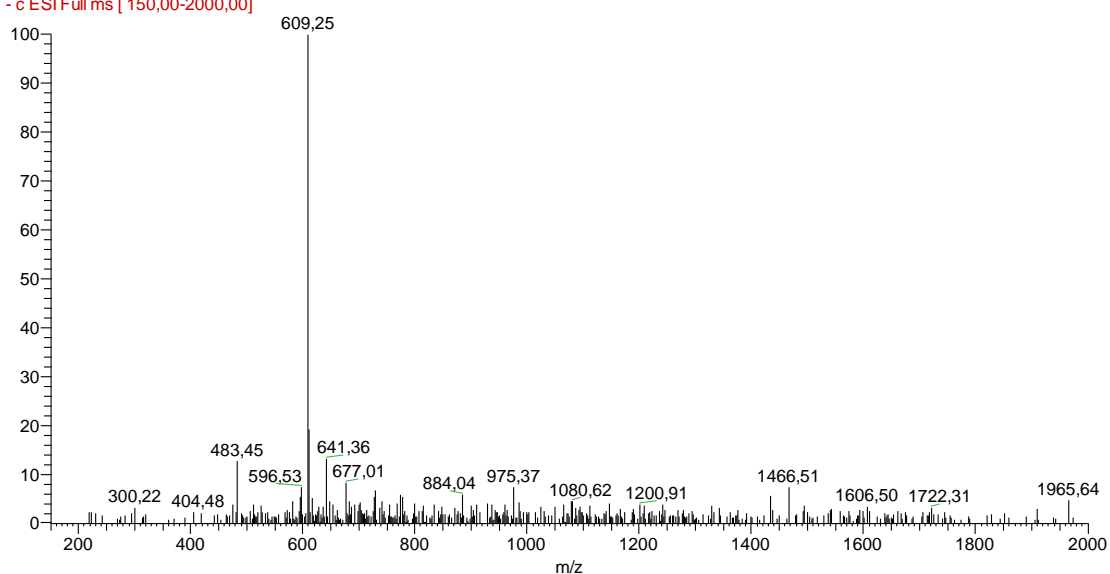


Figura 17 – Espectro de massa do pico de Tr: 11,80 minutos.

Kiwi_14Mai_LCMS_neg_01 #463 RT: 11,82 AV: 1 NL: 2,31E5
F: - c d Full ms2 609,23@35,00 [155,00-620,00]

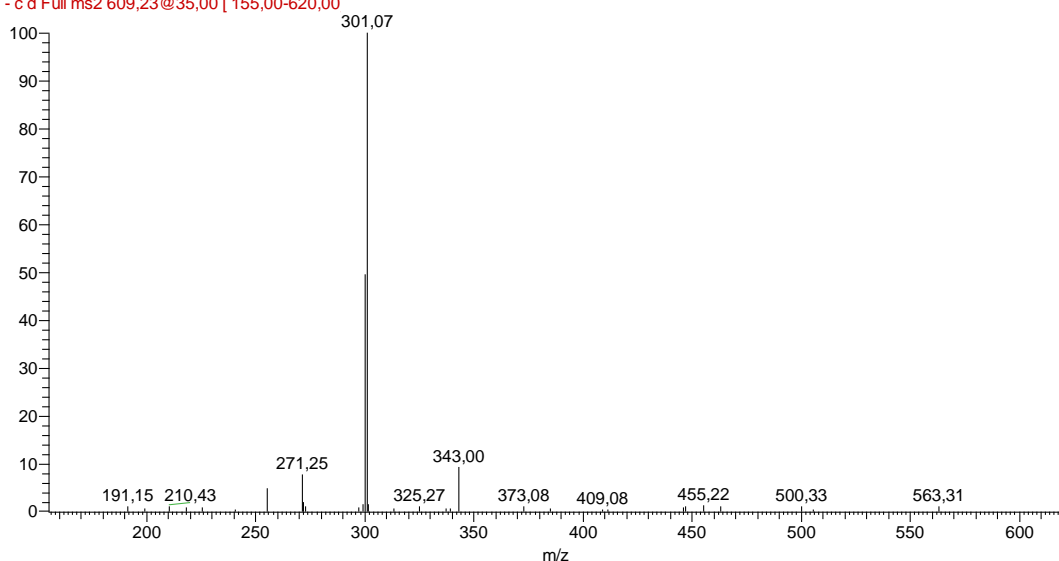


Figura 18 – Espectro de massa MS2 do pico de Tr: 11,80 minutos.

Kiwi_14Mai_LCMS_neg_01 #541 RT: 13,78 AV: 1 NL: 9,37E5
F: - c ESI Full ms [150,00-2000,00]

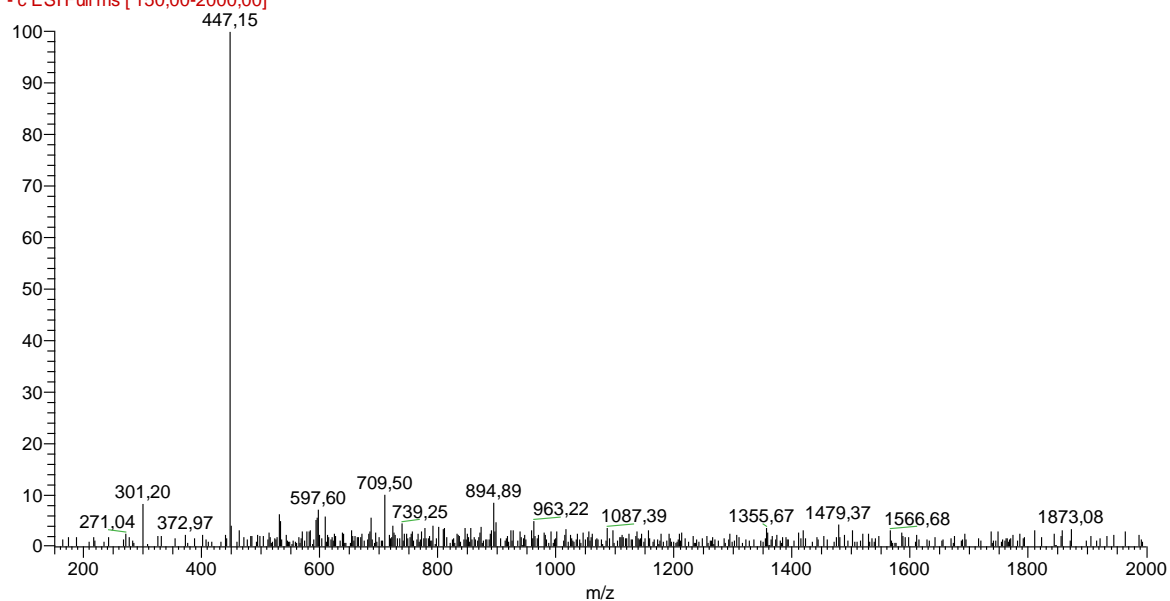


Figura 19 – Espectro de massa do pico de Tr: 13,85 minutos.

Kiwi_14Mai_LCMS_neg_01 #542 RT: 13,81 AV: 1 NL: 9,93E5
F: - c d Full ms2 447,23@35,00 [110,00-460,00]

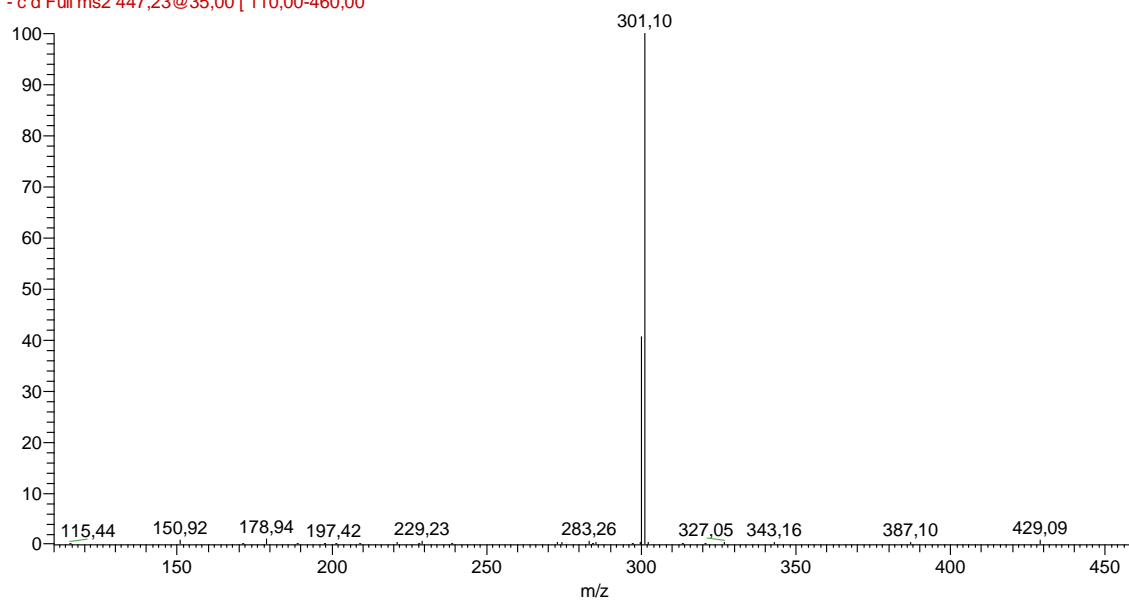


Figura 20 – Espectro de massa MS2 do pico de Tr: 13,85 minutos.

Kiwi_14Mai_LCMS_neg_01 #613 RT: 15,58 AV: 1 NL: 4,21E5
F: - c ESI Full ms [150,00-2000,00]

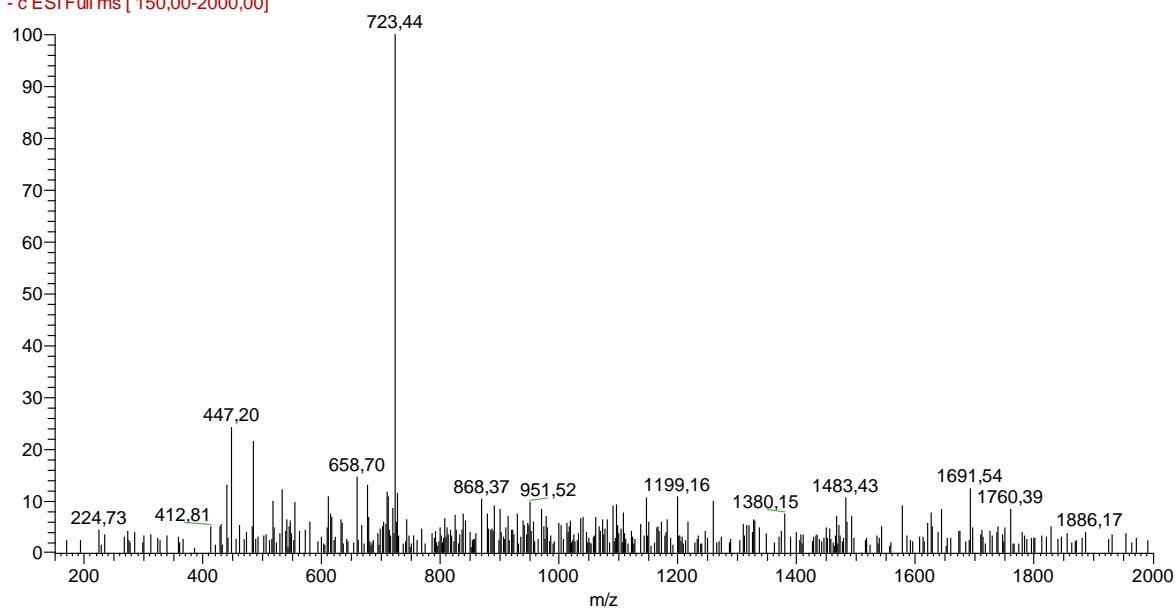


Figura 21 – Espectro de massa do pico de Tr: 15,58 minutos.

Kiwi_14Mai_LCMS_neg_01 #614 RT: 15,61 AV: 1 NL: 2,68E5
F: - c d Full ms2 723,29@35,00 [185,00-735,00]

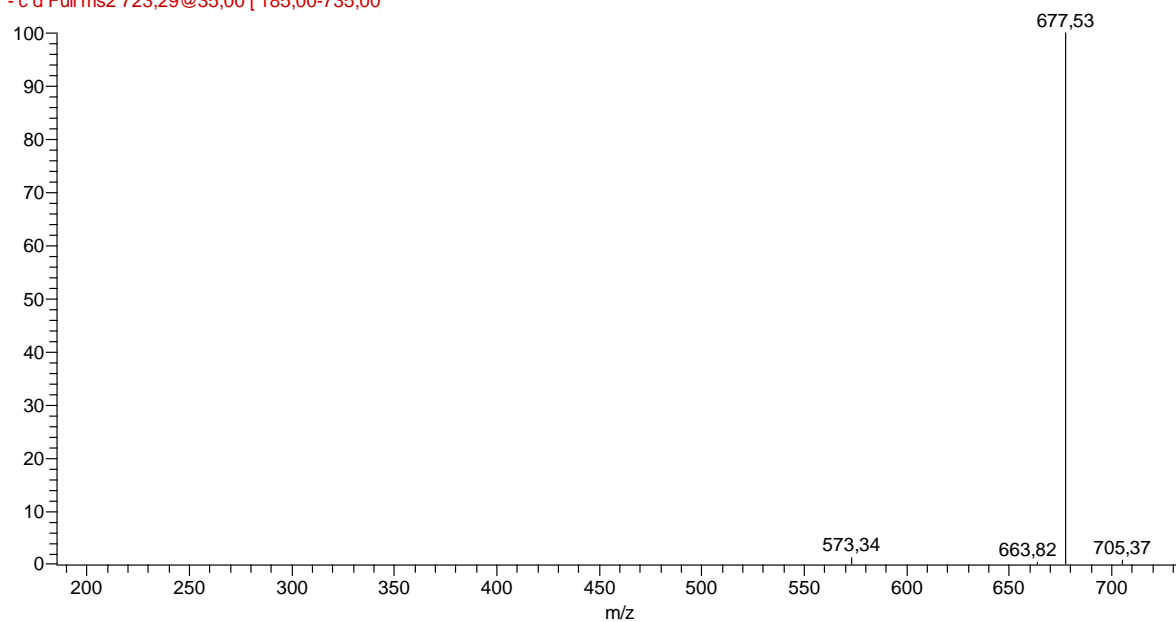


Figura 22 – Espectro de massa MS2 do pico de Tr: 15,58 minutos.

Assim, os compostos 1, 2 e 3 do cromatograma do extrato de *A. Deliciosa*, analisados por espectrometria de massa são os apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Lista de compostos e iões obtidos por LC-MS no modo negativo da infusão de “kiwi”.

	RT (min)	Name	[M-H]- (m/z)	MS2 Iões produto (m/z)	
“kiwi”	1	11.80	Rutina	609	301
	2	13.85	Canferol-3 -glucósido	447	301
	3	15.58	Taninos condensados com ácido glucorónido	723	677

5.2. Digestão *in vivo* das infusões por suco gástrico e pancreático

O consumo destas digestões implica a ingestão por via oral e portanto irão estar sujeitos aos sucos digestivos. Trabalhos anteriores (Porfirio, et al. 2010) demonstram que a atividade biológica de determinadas infusões pode ser alterada com a sua “digestão”, portanto é necessário estudar se existe alteração na composição química das infusões que possa ocasionar qualquer modificação na atividade biológica inicial. Assim, utilizaram-se suco artificiais simulando o suco gástrico e pancreático, tendo-se efetuado pesquisa de alteração na composição química das amostras retiradas ao longo dos ensaios, por HPLC, e em seguida atividades inibitórias da AChE e antioxidante.

As duas digestões foram analisadas após a recolha de alíquotas de cada infusão em contacto com os respetivos sucos de hora-a-hora, e foram posteriormente analisadas por HPLC-DAD a fim de verificar se existiam alterações significativas na composição de compostos fenólicos dos extratos após digestão dos mesmos. Este estudo foi também efetuado sobre as decocções comerciais.

5.2.1. Digestão pelo suco gástrico

A análise dos resultados da simulação da digestão das três infusões foi efetuado por HPLC. Os cromatogramas respectivos a cada extrato encontram-se na Figura 23 a 26. Os extratos metabolizados pelo suco gástrico analisados por HPLC-DAD foram submetidos ao processo artificial de simulação da digestão por este suco para verificar se existiria alguma alteração significativa nos cromatogramas das infusões quando submetidas à digestão pelo suco gástrico, que pudessem ser sugestivos de deterioração/metabolização dos compostos fenólicos existentes noutros.

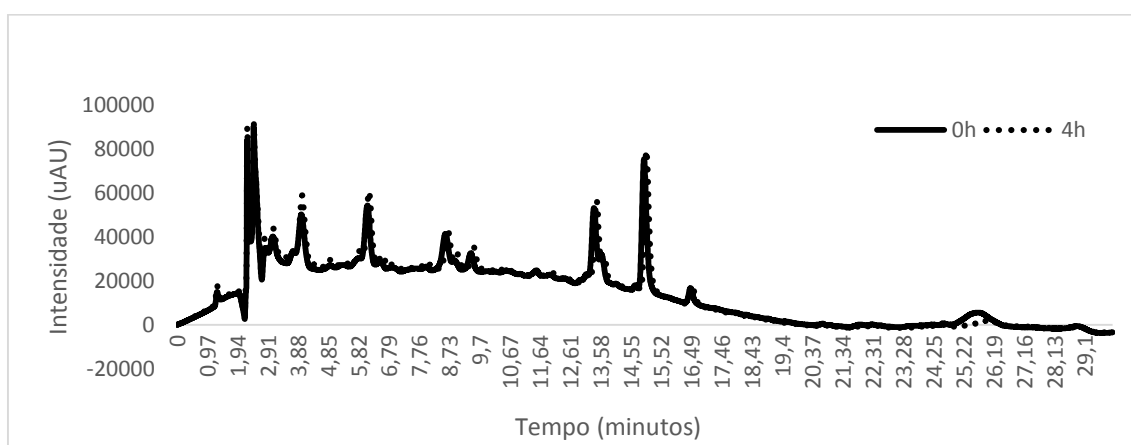


Figura 23 - Cromatograma da digestão pelo suco gástrico da infusão de folhas secas da árvore do “kiwi”, obtido por HPLC-DAD, para as 0 e 4 horas - “kiwi”.

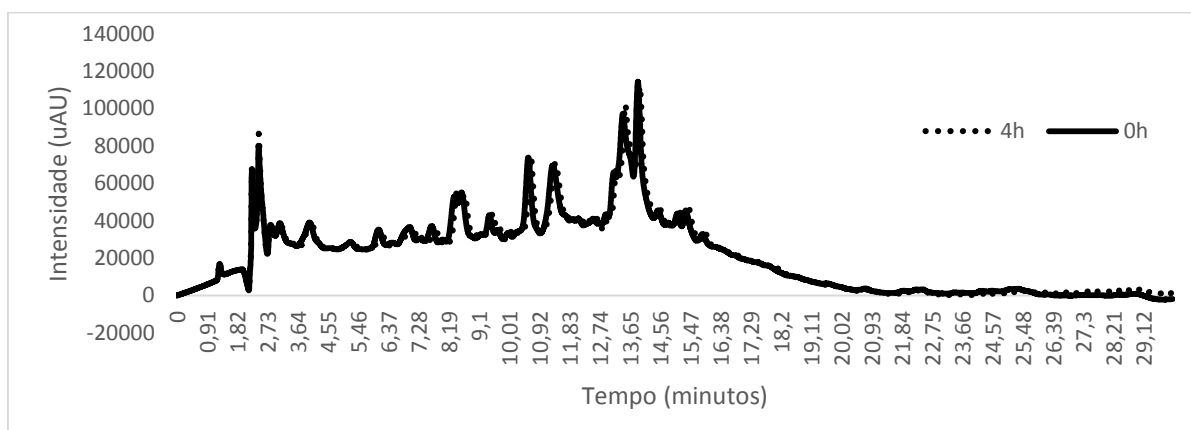


Figura 24 - Cromatograma da digestão pelo suco gástrico da mistura A, obtido por HPLC-DAD, para as 0 e 4 horas – 100%.

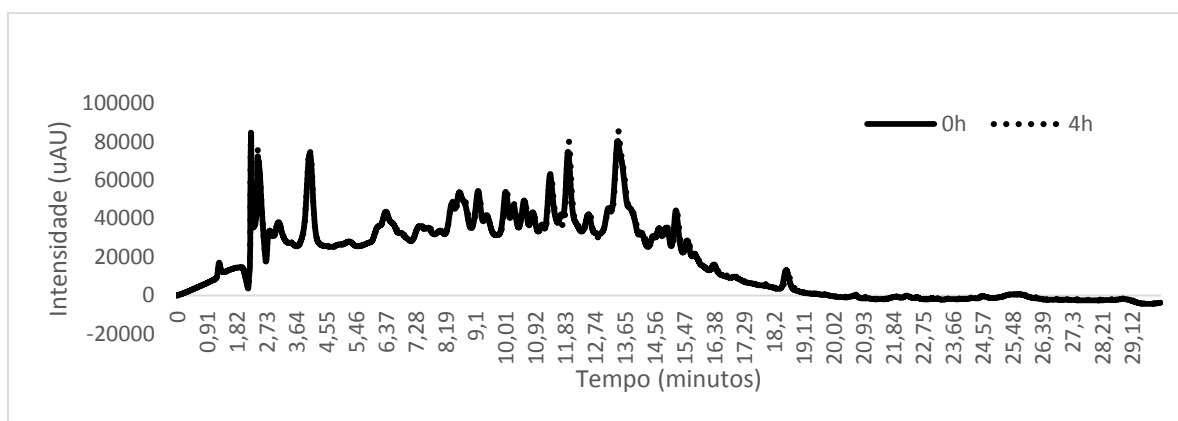


Figura 25 - Cromatograma da digestão pelo suco gástrico da mistura B, obtido por HPLC-DAD, para as 0 e 4 horas – Colesterolssil.

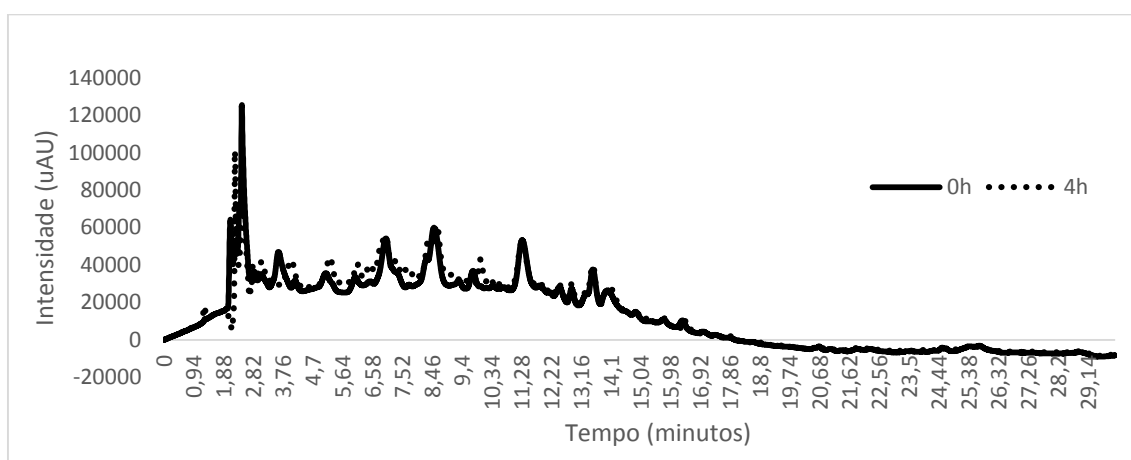


Figura 26 - Cromatograma da digestão pelo suco gástrico da mistura C, obtido por HPLC-DAD, para as 0 e 4 horas - Diesel.

Muitos extratos derivados das plantas possuem compostos fenólicos, ou derivados do ácido cafeico, ou dos flavonoides. Como se pode verificar pela comparação do cromatograma do tempo 0h com o do tempo 4h, não houve alteração significativa na composição das infusões que pudesse alterar a atividade das mesmas, querendo isto dizer que os compostos se mantêm durante a digestão e não ocorrem modificações das suas estruturas químicas. As diferenças nas sobreposições das 0h e das 4h pode dever-se à presença de resíduos de pepsina do suco, que interfere com o cromatograma e por vezes leva o aumento dos picos, como se pode verificar.

5.2.2. Digestão pelo suco pancreático

A análise dos resultados da simulação da digestão infusão de folhas de *A. Deliciosa*, e posteriormente das três infusões comerciais, foi efetuada por HPLC. Os cromatogramas respectivos a cada extrato encontram-se na Figura 27 a 30. Como dito anteriormente, os extratos metabolizados pelo suco pancreático analisados por HPLC-DAD, foram submetidos ao processo artificial de simulação da digestão com o mesmo fim do suco gástrico.

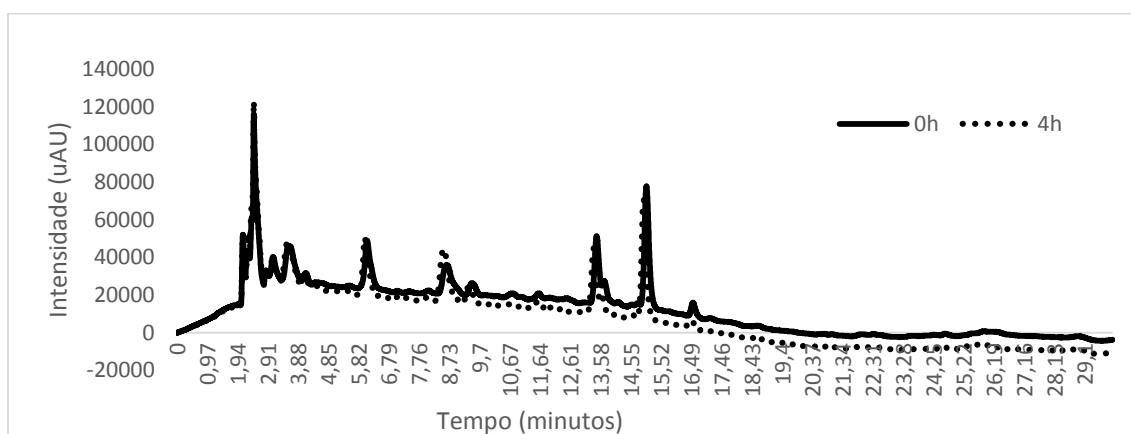


Figura 27 - Cromatograma da digestão pelo suco pancreático da infusão de folhas secas da árvore do “kiwi”, obtido por HPLC-DAD, para as 0 e 4 horas - “kiwi”.

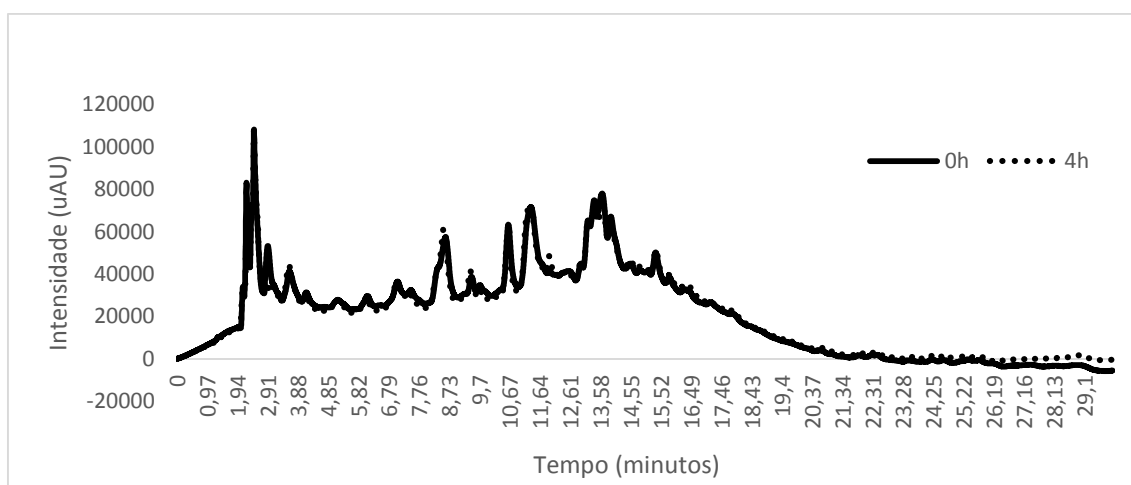


Figura 28 - Cromatograma da digestão pelo suco pancreático da mistura A, obtido por HPLC-DAD, para as 0 e 4 horas.

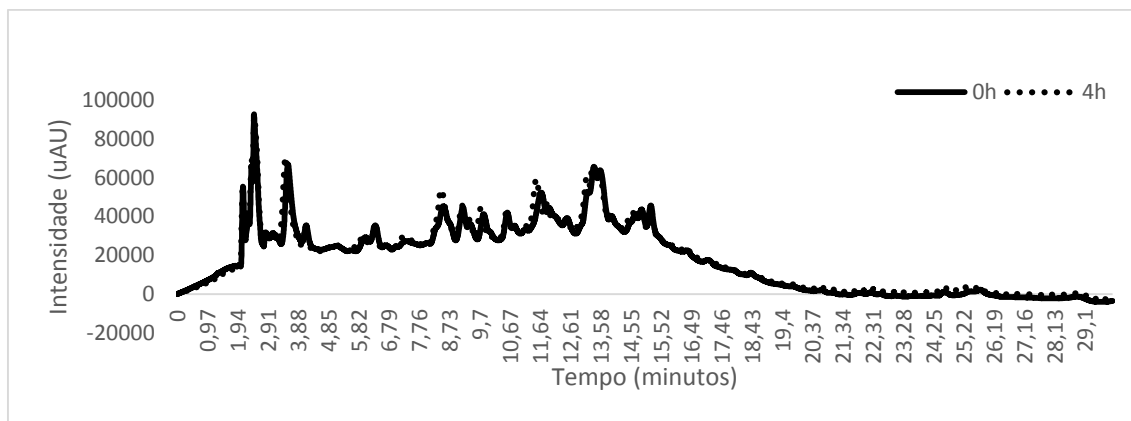


Figura 29 - Cromatograma da digestão pelo suco pancreático da mistura B, obtido por HPLC-DAD, para as 0 e 4 horas.

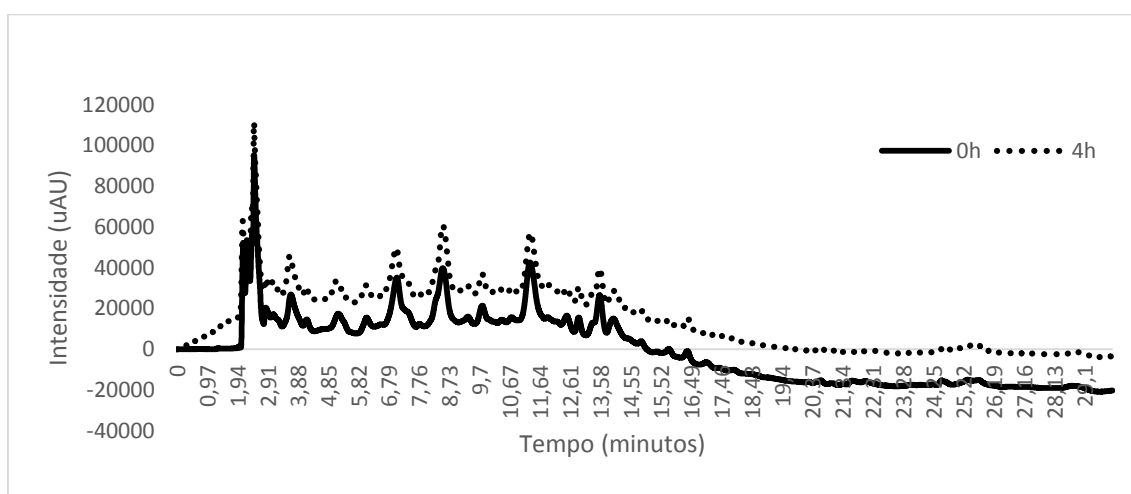


Figura 30 - Cromatograma da digestão pelo suco pancreático da mistura C, obtido por HPLC-DAD, para as 0 e 4 horas.

Tal como para o suco gástrico, não são visíveis diferenças significativas que possam alterar os cromatogramas, querendo isto dizer que os compostos se mantêm durante a digestão e nada lhes acontece. As diferenças nas sobreposições das 0h e das 4h pode dever-se à presença de resíduos de pancreatina do suco, que interfere com o cromatograma e por vezes leva o aumento dos picos.

A composição química destes extratos não foi alterada, indicando que os compostos presentes em qualquer dos extratos não sofre hidrólises catalisadas pelos enzimas gástricos e pancreáticos. Nesta situação as atividades

biológicas deverão permanecer inalteradas. Vários trabalhos têm indicado que os sucos digestivos podem produzir modificações estruturais, principalmente em compostos do tipo diterpenóides (Porfirio et al., 2010). Nos derivados de ácido cafeico e flavonoides, a composição química tem-se mantido constante durante esta etapa da digestão (Hernandez et al 2012).

5.3. Estudo de toxicidade em linhas celulares

O estudo da toxicidade foi realizado para que fosse possível determinar a concentração dos vários extratos que seria tóxica para as células.

Para as três infusões comerciais (A, B e C) e para a infusão de folhas de *A. Deliciosa* foram realizados testes de MTT para verificar a viabilidade celular, em diferentes concentrações para determinar qual a concentração considerada o máximo a usar em futuros ensaios daquela amostra. Pode verificar-se para todas as quatro infusões, a gama mais elevada de concentração, 2mg/ml não apresentou toxicidade celular, e não se encontrou nesta concentração um valor de IC₅₀. Pode então concluir-se que estas infusões não são tóxicas para as células com as quais se pretende trabalhar. Os valores podem ser vistos na tabela abaixo, Tabela 3.

Tabela 3 – Valores de toxicidade celular do “kiwi” em comparação com infusões comerciais.

Infusão	Toxicidade com 2mg/ml (%)
“kiwi”	5,2 ± 3,5
A	3,2 ± 1,7
B	-1,7 ± 2,6
C	3,4 ± 1,0

O valor de IC₅₀ considerado como tóxico é de 0,1 mg de extrato /ml (Oonsivilai et al, 2008).

5.4. Atividade Antioxidante

Para a determinação da capacidade antioxidante foi utilizado o método do DPPH. Neste método colorimétrico, pode presenciar-se a mudança da cor roxa do DPPH, para a cor amarela. Isto acontece quando o eletrão desemparelhado, é emparelhado com um átomo de hidrogénio do potencial antioxidante, neste caso os quatro extratos. Foram testadas diferentes concentrações de extrato, de modo a encontrar o valor de IC₅₀. Os resultados podem ser encontrados na tabela abaixo, Tabela 5.

As atividades esperadas devem estar relacionadas com a composição química de cada uma das infusões. De imediato verificar-se que as três infusões comerciais têm na sua composição ácido clorogénico, sendo este o composto comum a todas elas, devido à presença de *E. arvensis*, bem como também se verifica a presença de derivados do canferol (Falé et al, 2014, submetido). Na infusão de *A. deliciosa*, deteta-se apenas compostos do tipo flavonóides, como o canferol e a rutina. Em todas as infusões podemos detetar ácidos fenólicos e flavonóides, que tem atividades relacionadas com a atividade antioxidante.

Tabela 4 – Tabela de resultados da inibição pelo método do DPPH para as quatro infusões.

Extrato	IC ₅₀ (µg/ml)
“kiwi”	58,6 ± 2,7
A	43,4 ± 0,41
B	44,3 ± 2,23
C	49,7 ± 2,5

De acordo com estudos anteriores (Cao et al. 1997), os compostos fenólicos como sejam os flavonoides presentes no extrato de folha de *A. Deliciosa*, apresentam atividade antioxidante. A infusão de *A. Deliciosa* é a que apresenta o valor mais elevado de concentração para inibição de 50%, o que pode ser justificado possivelmente pela sua maior concentração de flavonóides em relação às restantes infusões, podendo mostrar também que os flavonoides

têm menos atividade antioxidante que os ácidos fenólicos (exemplo: ácido clorogénico).

Comparando com o padrão de BHT (14 µg/ml) (Falé et al, 2012), composto usado na indústria como antioxidante, verifica-se que os extratos apresentam uma concentração mais elevada que este composto para os mesmos efeitos, mas a sua vantagem é serem mais benéficos para o indivíduo que toma estes compostos, uma vez que as infusões são de caráter natural. De facto, e pelos estudos efetuados neste trabalho, os flavonóides apresentam atividade antioxidante, o que pode justificar os valores apresentados neste trabalho.

5.5. Inibição de AChE

Foram testadas diferentes concentrações de extrato, de modo a encontrar o valor de IC₅₀, através da medição da velocidade de reação e hidrólise de acetilcolina (análogo do substrato de AChE) em ácido acético e tiocolina, sendo que a última reage com DTNB originando um complexo de cor amarela. Os resultados dos ensaios da atividade inibitória do enzima AChE para as três infusões encontram-se nas tabelas abaixo, Tabela 6. Algumas das concentrações não puderam ser lidas, uma vez que os “chás” eram bastante corados e o espectrofotómetro não consegue certas amostras devido à sua intensidade colorimétrica.

Como dito acima, as atividades que se devem esperar, estão relacionadas com a composição química de cada uma das infusões estudadas neste trabalho. Pode-se imediatamente verificar-se que as três infusões comerciais têm na sua composição ácido clorogénico, sendo este o composto comum a todas elas, devido à presença de *E. arvensis*, bem como também se verifica a presença de derivados do canferol (Falé et al, 2014, submetido). Na infusão de *A. deliciosa*, podemos detetar apenas compostos do tipo flavonóides, como o canferol e a rutina, por exemplo. O que se verifica é que em todas as infusões podemos detetar ácidos fenólicos e flavonóides, que têm atividades relacionadas com este enzima.

Pode ver-se que a folha de *A. deliciosa* não contém na sua composição química ácidos fenólicos, como as infusões A a C, como pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 5 – Tabela de resultados da inibição por AChE para as quatro infusões.

Extrato	IC ₅₀ (mg/ml)
“kiwi”	0,801 ± 0,02
A	0,61 ± 0,08
B	0,668 ± 0,09
C	0,588 ± 0,15

Em cada um dos extratos foi determinado o valor de concentração deste que inibe 50% da atividade do enzima. O valor com menor IC₅₀ foi o da infusão C com 0,588 mg/ml e o valor com menor IC₅₀ foi o da infusão de *A. deliciosa* com 0,801 mg/ml.. É de salientar que a infusão das folhas do “kiwi” revela ter algum potencial neste tipo de uso (para o colesterol).

Os flavonoides são os compostos maioritários da infusão de “kiwi”. Estudos feitos anteriormente (Hernandez et al, 2010) demonstram que os flavonóides têm ação inibitória sobre a AChE, o que se pôde ver com o extrato de folhas e *A. deliciosa*, visto os seus componentes maioritários serem flavonóides. Quando comparados com os valores padrão dos flavonoides por si só, como seja a quercetina e a isoquercitina, os valores são 62 ± 2 µg/ml e 63 ± 2 µg/ml, respetivamente (Hernandez et al 2009).

5.6. Interação das infusões com o fármaco com estatinas (Sinvastatina 10 mg)

Em trabalhos anteriores tinha sido determinada a atividade inibitória de HMG-CoA reductase dos extratos das misturas de plantas comerciais (Falé et al., 2014). Optou-se por utilizar os valores de quantidade de extrato que conduzem a 50% de inibição do enzima e adicionar sinvastatina na concentração que

também origina 50% de inibição do enzima, previamente determinada em Falé et al., (2014).

Após ensaio de HMG-CoA reductase com os dois inibidores (a estatina e o extrato), os resultados foram os seguintes, expressos na Tabela 5. Par fazer este ensaio utilizaram as concentrações de extrato (IC₅₀) indicada em Falé et al, 2014.

Tabela 6 – Percentagens de inibição e desvios-padrão do “kiwi” e das três infusões após ensaio de HMG-CoA reductase com o inibidor Sinvastatina. (POR EM CIMA OS TITULOS DAS TABELAS).

Infusão	Inibição (%)
A	86,10 ± 22,93
B	89,40 ± 15,67
C	91,13 ± 15,67
Sinvastatina	89,75 ± 14,65

Pela comparação dos resultados obtidos neste ensaio, podemos ver que os extratos, quando presentes no mesmo ensaio com a estatina, estes conseguem ter um valor de quase mais 30% de inibição do que quando sozinhos (é de ter em conta que a concentração usada neste ensaio para a estatina e para os três extratos foi o valor ao IC₅₀ obtido nos ensaios de HMG-CoA individuais em estudos anteriores – Falé et al, 2014, submetido).

Como referido acima, seria interessante ver o que ocorreria se baixássemos o valor de concentração da estatina e mantivéssemos o valor do IC₅₀ das infusões. Possivelmente veríamos crescer a percentagem de inibição do extrato em relação à estatina, fazendo com que se baixasse a dose da mesma, tornando-se benéfico para o consumidor. No caso da infusão C, podemos verificar que em conjunto com o fármaco conseguimos uma inibição relativamente superior aos restantes, que ficam abaixo da inibição só com o

fármaco. Assim, pode entender-se que a infusão C aumenta ligeiramente as capacidades de inibição quando em conjunto com o fármaco.

Com isto pode concluir-se que os “chá”s também inibiram o enzima, o que faz alterar os valores de inibição quando em conjunto com o fármaco, bem como altera também a dose de “chá” ou fármaco a tomar, sugerindo que as pessoas estarão a tomar uma dose de inibidor superior ao recomendado.

6. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos nos estudos de atividade antioxidante e da atividade inibitória da AChE da infusão de folhas de “kiwi” e das infusões A a C, podemos verificar que diferentes composições de extrato (confirmadas por LC-MS) influenciam as atividades referidas. Uma vez que a ingestão de plantas do tipo medicinais, é na sua grande maioria efetuada por ingestão de “chá”s, é importante que se saiba a sua composição, para atribuir o seu efeito a um determinado grupo de compostos. Para estas atividades conseguimos perceber que ambos os extratos atuam sobre os mecanismos da atividade antioxidante e da AChE.

Os polifenóis são composto importantes, que são responsáveis pela presença das atividades acima referidas, na sua grande maioria. No caso do extrato de “kiwi”, pode atribuir-se a sua atividade a compostos do tipo flavonoides, mas nas infusões A a C, essa atividade deve-se aos ácidos fenólicos, como seja o ácido clorogénico, a rutina, o ácido cafeico, entre outros.

Verificou-se também que os extratos, após a “digestão” mantém a sua composição química inicial, levando a crer que não é metabolizado pelo suco gástrico nem pelo suco pancreático, sendo a sua metabolização levada a cabo por outro tipo de sucos e enzimas.

Os resultados obtidos em todos os estudos, mostram que o extrato de folhas de “kiwi” é promissor no que toca a doenças relacionadas com a inibição de AChE, como sejam o Alzheimer e a motilidade gastrointestinal. O mesmo potencial é referido para as infusões A a C. esta variedade de atividades em que os extratos atuam pode ser uma vantagem quando se fala de terapêutica para estas doenças.

6.1. Perspetivas futuras

Seria interessante determinar a atividade sobre o enzima HMG-CoA reductase do “kiwi”, bem como tentar perceber para todas as quatro infusões, qual será o mecanismo pela qual as infusões inibem o colesterol, por exemplo, se atua

obre o seu recetor, o NPC1L1. Também poderia ser estudas as interações das infusões com o fármaco Sinvastatina, alterando as concentrações do fármaco, com vista a melhorias na terapêutica dos níveis elevados de colesterol.

8. Bibliografia

Allender S, Scarbrough P, Peto V, *et al.* (2008) *Mortality, Chapter 1. British Heart Foundation Statistics*, website:www.heartstats.org.

Analysis of Flavonoids in Ginkgo Biloba Extract, Shimadzu; Application News, High Performance Liquid Chromatography, No. L405.

Belay, A; *Spectrophotometric Method for the Determination of caffeic Acid Complexation and Thermodynamic Properties*, International Journal of Biophysics; 2(2), pg 12-1, 2012.

Berg J, Tymoczko J, Stryer L, (2002) *Biochemistry*, 5th Edition, New York, WH Freeman.

Corsini, A.; Franco, M.; Alberico, L.; *Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase*; Pharmacological Research; Vol.31, No.1, 1995.

Cunha A, Teixeira F, Silva A, Roque O, (2010) *Plantas na terapêutica farmacologia e ensaio clinico*, ed. Edição. Fundação Calouste Gulbenkian, 2001(53): pg. 425-432.

Falé P, *et al* (2010) *Function of Plectranthus barbatus herbal tea as neuronalacetylcholinesterase inhibitor*. Food Function, 2: 130-136.

Falé P, Ferreira C, Serralheiro ML (2013) *Evaluation of cholesterol absorption and biosynthesis by decoctions of Anona cherimolla leaves*. J Ethnopharmacol 150: 718-723.

Falé P, Ferreira C, Serralheiro ML (2013) *Effect of luteonin and apigenin on rosmarinic acid bioavailability in Caco-2 monolayers*, Food Funct 4: 426-431.

Falé P, Ferreira C, *et al* (2013) *Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of commercially available medicinal infusions after in vitro gastrointestinal digestion*. Journal of medicinal Plants Research, vol 7, pg 1370-1378.

Falé P, Ferreira C, Rodrigues A, (2014) *Studies on the molecular mechanism of cholesterol reduction by Fraxinus angustifolia, Peumus boldus, Cynara cardunculus and Pterospartum tridentatum*. J Med Plant Res 8: 9-17.

Falé P, Tavares MJ, Correia A, Ribeiro MJ, *et al*, (2014) *Phenolics in herbal infusions used for cholesterol reduction: intestinal absorption and HMG-CoA reductase inhibition*; LWT Food Science and Technology, 2014, submetido.

Ferreira A, Proença C, Serralheiro ML, Araújo M, (2009) *Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença e Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo*. Revista Psiquiatria Clínica, 37 (2): 66-72.

Garcia-Calvo M, Lisnock J, Bull HG, et al. (2005) *The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like1 (NPC1L1)* P NatlSci USA 102:8132-8137.

Halliwell B, (2001) *Free radicals and other reactive species in diseases*, in eLS, John Wiley & Sons, Ltd.

Hardman Joel; Limbird Lee; *Goodman and Gilman's – The Pharmacological Basis of Therapeutics*, International Edition; Tenth Edition, 2001.

Hernandez M. et al (2010); *Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of the water extracts of several Hypericum species*, Doof Chemistry; 120: 1076-1082.

Hirota C., McKay D, (2006) *Colinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine*. *British Journal of Pharmacology*. 149: 463-479.

<http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED>, em 29-4-2014, às 21 h 32.

Leopoldini M, Malaj N, Toscano M, et al. (2010) *On the inhibitor effects of bergamot juice flavonoids binding to the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR) enzyme*. J Agric Food Chem 58:10768-73.

Liscum L., Cholesterol biosynthesis, *Chapter 15 ; Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membrane*; 4th Edition, Elsevier Science 4^a ed; 409-431.

Manach, C.; et al.; *Polyphenols: food sources and bioavailability*; Am J Clin Nutr; 79: 727-47, 2004.

MTT Cell Proliferation Assay, ATTC®, 30-1010K, American Type Culture Collection, Manassas, USA.

Oonsivilai R, Ferruzi MG, Ningsanond S, (2008), *Antioxidant activity and cytotoxicity of rang chuet (thunbergia laurifolia Lindl.) extracts*. As. J. Food Ag-Ind. 1:116-128

Osswald W; Guimarães S; *Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas*, 4^a Edição; Porto Editora.

Pepeu, G. e Giovannini, MG.; *Cholinesterase Inhibitors and memory*, Chem-Biological Interactions, 187: 403-408.

Pinto A, et al, (2010) *Nutracêuticos e alimentos funcionais*, 1^a Edição, Lisboa, Lidel – edições técnicas; 15-36.

Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M. *Farmacologia*, editora Guanabara Koogan, 4^a ed; 247-253.

Rice-Evans, C.; et al.; *Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*; Free radical Biology and Medicine; Vol.20, No.7, pp. 933-956, 1996.

Riss T, et al, *Cell viability Assays*, Assay Guidance Manual.

Samuelsson G, (2004). *Drugs of natural origin*; 5th revised edition, Stockholm: Apotekarsocieteten.

Scandinavian Simvastatin Survival Study Group 1994 *Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study* (45). Lancet 344: 1383-1389.

Site da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, <http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0405/estatinas/aboutme.htm>; a 14-4-2014, 10h30.

Stancu C, Sima A, (2001) *Statins: Mechanism of action and effects*, J. Cell. Mol. Med., Vol. 5, Nº 4, pp 378-387.

Technical bulletin of HMG-CoA reductase assay kit, Sigma Aldrich. Catalogue number CS1090.

Treasure C B et Al. 1995 *Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients in patients with coronary artery disease*; N Engl J Med 332: 481-487.

Ventura, A.; Abreu, P.; Freitas, R.; Sathler, P.; Loureiro, L.; castro, H.; *Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a Doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo*; Revisão de literatura; 2009;

Wang S, Yu H, Wickliffe J, (2011) *Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂*, Toxicology in vitro, 25: 217-2151.